

TITLE OF THE INVENTION

NOVEL COMPUTATION WITH NUCLEIC ACID MOLECULES, COMPUTER AND SOFTWARE  
FOR COMPUTING

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is based upon and claims the benefit of priority from the prior Japanese Patent Applications No. 2000-382449, filed December 15, 2000; and No. 2000-399415, filed December 27, 2000, the entire contents of both of which are incorporated herein by reference.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

1 Field of the Invention

本発明は、核酸分子を使用する新規な情報処理方法、計算装置および計算用ソフトウェアに関する。

15

2 Description of the Related Art

半導体シリコンを用いた計算機はその誕生以来大きく性能を伸ばし、安価に複雑な計算をこなして人類に貢献してきた。これら半導体シリコンを用いた計算機は主に0と1の2値で計算を進めるノイマン型計算機である。

20

コンピュータ科学の分野において研究対象として有名な問題の中にNP完全問題という問題がある。このようなNP完全問題の例は巡回サラリーマン問題、蛋白質の3次元構造の予想などである。従来では、このような問題を完全に解くためには、全ての可能な解を問題に当てはめて、その問題が解けるか否かを検証していく方法と、近似解を求ることによって問題を解く方法とが用いられてきた。前者の方法では、解答を得るために要求される計算時間は、問題の規模に比例して指数関数的に増加していく。また、後者的方法は、このような計算を高速に行うために提案されたものである。近似解を求めるためのアルゴリズムがいくつか提案してきた。これらのアルゴリズムでは厳密解が求まるとは限らず、解を見落とす可能性がある。

25

前者の方法によって、全ての解を高速に求めるためには、現在の技術では計算機を並列化し、多数の計算機で並行して計算することが考えられる。ところ

TOKYO 2000-399415

が計算機数が増加すれば消費電力が増え、より広い設置場所も要求される。また計算機を並列化するには計算機同士の通信をどうするか、どんな接続法を採用するかなどの技術的課題も多い。

一方、ノイマン型計算機で解くのが難しい問題を解くのために、1994年にエイデルマン (A d l e m a n) によってDNAコンピューティング (D N A c o m p u t i n g) と称される新たな計算機パラダイムが提案された (S c i e n c e, 266, 1021-4)。即ち、エイデルマンは小規模な巡回セールスマン問題を説くために、DNAを用いて経路に対応するDNAを形成させ、その中から解のDNAを選択する方法を用いた。また、DNA分子で加算を行うというグアニエリ (G u a n i e r i) らによる報告もある (S c i e n c e, 273, 220-3)。このように分子による演算の可能性についての探索が行われてきた。

DNAを演算に用いると次のような点で有利であることが明らかになっていく。例えば、数十塩基程度の短いDNA分子の1 p m o l ( $= 10^{-12}$  m o l) は、 $100 \mu L$ の緩衝溶液に容易に溶解し、その上、その分子数は約 $6 \times 10^{11}$ 個にものぼる。従って、この膨大な数の分子が相互作用により解を表す分子を形成するならば、従来のコンピュータを用いて行う並列計算するよりも遙かに大きな並列数で解を求めることができる。また、1 m Lにも満たない溶液中でもこの反応は行えるため、加温冷却を行ってもエネルギーはほとんど消費されない。これらのDNAを使った計算機は、多変数の大きな問題に適用したときにノイマン型計算機の処理速度を凌駕すると予測される。しかしながら、現在のところ、実用化に耐えることができ、且つ、効果的にDNA分子により分子計算を行える装置は開発されていない。

25

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

以上のような状況に鑑み、本発明の目的は、基本的には、分子演算の並列性を利用して従来の電子コンピュータよりも高速に論理式を評価することが可能な反応と分子計算一般に適用できる分子計算装置による計算を提供することである。

30

上記の課題は、以下の手段により解決される。即ち、

演算用核酸を用いた情報処理方法であって、

(a) 複数の任意の情報に応じて、それらの情報をそれぞれの核酸分子に変換すること；

5 (b) 検出したい条件を示す論理式を反映するように配列を設計された演算用核酸に、(a) で得られた核酸分子をハイブリダイズし、伸長すること；および

(c) (b) で伸長された核酸に含まれる核酸分子の結合様式を検出することによって前記論理式の解が真であるか偽であるかを評価すること；  
10 を具備する核酸分子を用いた情報処理方法である。

このような方法により、特に、特定の配列を有する核酸を用いて、その存在または不存在を評価することにより、演算を行うことにより、論理式の計算を従来の電子コンピュータよりも高速に処理することが可能である。

また、このような方法によって、例えば、遺伝子型や遺伝子の発現の状態を決定すること等が可能である。

更に、本発明の更なる目的は、上述の演算用核酸を用いた情報処理方法を実行するための計算装置を提供することである。上記の課題は、以下の手段により解決される。即ち、

電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部が、実質的に分子計算部の機能を制御する分子計算装置  
20 である。

このような装置は、遺伝子解析のためばかりではなく、NP完全問題等の困難な数学的問題を解くために有利な、超並列計算を高速に行う分子計算装置としても有用である。

上述の方法において、本発明者らは、遺伝子の解析を、核酸分子を入力データとして用いる計算として捉えるというオリジナルなアイデアに着想した。例えば、発現mRNAおよびゲノム上の遺伝子を符号化核酸のデータに変換することで、以降の計算で検索や、それらデータの論理和、論理積、否定を計算することで、遺伝子型判定や特定の疾患での遺伝子の発現条件を計算により求めることができる。このような発想を基に、遺伝子解析を、計算として、プログラミングし計算結果を得る分子計算装置が提供できるのである。

Additional objects and advantages of the invention will be set forth in the description which follows, and in part will be obvious from the description, or may be learned by practice of the invention.  
5 The objects and advantages of the invention may be realized and obtained by means of the instrumentalities and combinations particularly pointed out hereinafter.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWING

10 The accompanying drawings, which are incorporated in and constitute a part of the specification, illustrate presently embodiments of the invention, and together with the general description given above and the detailed description of the embodiments given below, serve to explain the principles of the invention.

図 1 は、遺伝子検出反応工程における各分子の状態を示す模式図。

図 2 は、標的が存在した場合の反応系における各分子の状態を示す模式図。

図 3 は、ストレプトアビジン磁気ビーズによる捕獲工程における各分子の状態を示す模式図。

20 図 4 は、D C N<sub>i</sub> の抽出工程における各分子の状態を示す模式図。

図 5 は、抽出工程で得られた D C N<sub>i</sub> に相補的な配列の増幅の模式図。

図 6 は、図 5 の増幅により得られた増幅産物を捕獲する工程における各分子の状態を示す模式図。

25 図 7 は、熱変性により一本鎖化する工程における各分子の状態を示す模式図。

図 8 は、発現遺伝子の情報を存在分子に変換する工程における各分子の挙動を示す模式図。

図 9 は、非発現遺伝子を検出し、不存在分子に変換するための最初の工程における有無変換オリゴヌクレオチドと存在分子の反応を示す模式図。

30 図 10 は、ある非発現遺伝子のための有無変換オリゴヌクレオチドの状態を

示す模式図。

図 1 1 は、有無変換オリゴヌクレオチドの抽出工程における分子の状態を示す模式図。

図 1 2 は、ストレプトアビジンを固定した磁気ビーズによる  $D C N_k *$  の捕5 捉とハイブリダイゼーションによる抽出工程における各分子の状態を示す模式图。

図 1 3 は、演算用核酸を示す模式図。

図 1 4 は、演算用核酸と存在分子および不存在分子とのハイブリダイゼーション工程における各分子の状態を示す模式図。

図 1 5 は、図 1 4 の工程の後に演算用核酸にハイブリッドした前記分子を伸10 長する工程における各分子の状態を示す模式図。

図 1 6 は、マーカーオリゴヌクレオチド  $M_1$  および  $M_2$  による計算結果の検出工程における各分子の状態を示す模式図。

図 1 7 は、不存在分子の增幅のために不在分子を抽出回収する工程における各分子の状態を示す模式図。

図 1 8 は、不存在分子の增幅のための P C R 工程における各分子の状態を示す模式図。

図 1 9 は、図 1 8 の工程により生じた增幅産物を捕獲する工程における各分子の状態を示す模式図。

図 2 0 は、図 1 9 の工程で回収された增幅産物を 1 本鎖にする工程における各分子の状態を示す模式図。

図 2 1 は、図 2 0 の工程の 1 本鎖に対する不存在分子のハイブリダイゼーションを行う工程における各分子の状態を示す模式図。

図 2 2 は、演算用核酸のランダムライブラリの作製方法において使用する連25 結用相補核酸と、連結対象となる演算用核酸の一部分を示す模式図。

図 2 3 は、遺伝子解析のためのエンコード反応とデコード反応とを示すフローチャート。

図 2 4 は、遺伝子解析のための分子設計例を示す図。

図 2 5 は、本発明の分子計算装置を示すブロック図。

図 2 6 は、本発明の分子計算装置の処理フローチャート。

図27は、本発明の分子計算装置を示すブロック図。

図28は、本発明の分子計算装置の各部の配置を示す模式図。

図29は、コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

図30は、コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

5 図31は、コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

図32は、コマンドの処理の概要を示すフローチャート。

図33は、プログラムの流れを示すフローチャート。

図34は、配列の同定方法の例を示す概念図。

図35は、配列同定の結果を示すチャート。

10

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

本発明の1側面において、核酸分子を用いるデータ並列計算方法が開示される。具体的には、核酸分子を情報を担う媒体として機能させ、その核酸分子が担う情報を、酵素やハイブリダイゼーション等の反応によって演算処理する情報処理方法である。

ここで使用する「核酸分子」および「分子」とは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNAおよびRNAを意味する。また、ここにおいて「核酸分子」と「分子」とは交換可能に使用される。

20 核酸分子による情報処理の並列性は非常に高いものである。例えば、分子生物学で、頻繁に使用される $100\mu M$ のDNAオリゴヌクレオチド溶液 $1mL$ 中には、 $6 \times 10^{16}$ のDNAオリゴヌクレオチド分子が存在する。1本のDNAオリゴヌクレオチド分子で1文字を表現したとすると $60,000,000$ ビットの記憶容量に相当する。例えば、ひとつの命令を実行するのに $10^3$ 秒かかったとしても $6 \times 10^{16}$ のDNA分子において、同時に命令が実行されれば、1秒当たり $6 \times 10^{13}$ の命令を実行したことになる。従って、核酸分子による情報処理の並列性は非常に高いのである。即ち、データやプログラムを核酸分子を用いて表現し、該核酸分子の分子反応によって命令を実行することにより、従来の電子コンピュータに比べて桁違いに大きなメモリ容量と高い並列処理能力を実現することが可能となる。

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

本発明のもう 1 側面は、このような核酸分子を用いて計算を実施することによって、核酸解析を行う方法を開示する。また、本発明の更なる 1 側面は、このような核酸計算を用いて、ゲノム情報解析を行う一般的な計算方法論を提案するものである。特に、該ゲノム情報解析方法では、以下のような利点が得られる。即ち、そのような方法では、先ず、特定の遺伝子の塩基配列に対して、任意に設計した所望配列を任意に割り当てる。そして、その割り当てに従って、該特定の遺伝子の塩基配列を設計された配列に変換し、変換後に得られた熱安定性のそろった配列を演算に使用することが可能である。従って、反応の設計における自由度が高くなり、且つ正確な反応を実施することが可能になる。

本発明の更なる側面において、上記の方法を実施するための計算機が開示される。上記の情報処理方法および解析方法は、人間の手により、核酸分子および種々の試薬を操作して、反応を実施させることが可能である。しかしながら、これらの操作を、各入力操作以外は装置が自動で実施する装置により行い、情報処理および計算並びに遺伝子またはゲノム解析を行うことも可能である。そのような装置は、本発明の態様の 1 つである。またこの計算機は分子計算一般に適用が可能である。

以下、例を、本発明について更に詳しく説明する。

### I. 計算方法

#### 1. 第 1 の実施の形態

##### (1) 概要

本発明の第 1 の実施の形態について述べる。第 1 の実施の形態は、核酸分子による演算によって、遺伝子の有無を判定する遺伝子解析の例を示す。

その概要は以下の通りである。まず、細胞で発現された遺伝子群を基に c D N A 群を作製する。得られた c D N A 群に含まれる発現遺伝子と、含まれない非発現遺伝子に関する情報、即ち、標的遺伝子の有無に関する情報を、人工的に設計した配列をもつ D N A 分子の形態に変換し、表現様式を変更する。この変換によって得られた D N A 分子を、演算用核酸に対してハイブリダイゼーションする。以上の過程が演算解析の過程である。ここで、前記 D N A 分子は、特定の標的遺伝子が存在しているか否かの情報を担う一種の信号として機能する。

例えば、ある標的遺伝子が存在することを確認することによって、当該遺伝子が発現遺伝子であることが判定できる。或いは、その標的遺伝子が存在しないことを確認することによって、当該遺伝子が非発現遺伝子であることが判定できる。従って、本解析方法では、サンプル中に含まれる標的分子を検出することが可能であるばかりではなく、同時に、サンプル中に含まれない標的分子に関しては、それが存在しないという情報を得ることが可能である。

### (1. 1) 準備

本の 1 様である計算方法には以下のような分子が必要である。実質的な計算に先駆けて、以下の分子を調製することが必要である。当該調製はそれ自身公知の方法により行うことが可能である。

溶液に含まれる c D N A を検出するために図 1 に示す 2 つのプローブ、即ち、点線で囲まれた  $a_i$  と  $A_i$  を準備する。 $a_i$  は、標的の c D N A の一部の配列に相補的な配列を含み且つ 5' 端にビオチンを標識したオリゴヌクレオチドである。 $A_i$  なるオリゴヌクレオチドは部分的にハイブリダイゼーションにより 2 本鎖になったオリゴヌクレオチドである。 $A_i$  を構成する 2 本鎖のうちの一方のオリゴヌクレオチドは、人工的に設計された S D 、 D C N <sub>i</sub> および E D なる塩基配列を 3' 端側に有し、標的の c D N A の一部分の配列に相補的であり且つ  $a_i$  分子の標的に相補的な配列に隣接するような配列を 5' 端側に有する。また、前記人工的に設計した塩基配列は、当該相補的な配列よりも 3' 末端側に配置される。また、 $A_i$  の標的 c D N A に相補的な配列の 5' 端はリン酸化されている。2 本鎖  $A_i$  を構成するもう 1 方の鎖は S D 、 D C N <sub>i</sub> および E D の配列に相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドである。 $a_i$  および  $A_i$  は、検出したい標的遺伝子毎に任意に設計する。ここでいう「標的遺伝子」とは、溶液中に存在するまたは存在しないことを検出したい遺伝子である。またこのとき、 D C N <sub>i</sub> の配列は標的ごとに異なる配列になるように設計し、 S D および E D はすべての  $A_i$  で共通する配列になるように設計する。これらの人工的な配列は、任意に設計可能であるので、所望する T m 値を設定することが可能である。従って、熱安定性をそろえ且つミスハイブリダイゼーションの少ない反応を行うことが可能である。

更に、図 5 に示すような 5' 端にビオチン標識をした S D 配列と同じ配列を

有するプライマー 1 と、ED配列に相補的な配列を有するプライマー 2 が必要である（図 5）。

また更に、図 8 に示すような「標的が存在すること」を示す DCNi に相補的な配列を有する存在オリゴヌクレオチド 3（図 8）と、「標的が存在しないこと」を示す DCNi\* に相補的な配列を有する不存在オリゴヌクレオチド 6（図 12）が必要である。

また、図 9 に示すような有無変換オリゴヌクレオチド 4 が必要である。これは、DCNi に対応するように人工的に設計され且つ DCNi とは異なる配列を有した塩基配列である DCNi\* を 5' 端側に具備し、その 3' 端側には DCNi 配列を具備するオリゴヌクレオチド（図 9）である。

#### （1. 2）存在分子と不存在分子への変換

本発明の方法では、まず、サンプル中に、特定の標的分子が存在しているという情報を「存在分子」に変換し、特定の標的分子がある系に存在していないという情報を「不存在分子」に変換する。ここで使用する「存在分子」と「存在オリゴヌクレオチド」の語は互いに交換可能に使用される。また「不存在分子」と「不存在オリゴヌクレオチド」も同様に交換可能に使用される。

このような分子の存在、不存在を分子形態表現に変換する方法について図 1 から図 12 を用いて説明する。図 1 から 23 は、それぞれの工程における系に存在する分子を模式的に示したものである。

図中、DNAを矢印により示し、矢印の元部をDNAの 5' 端とし先端を 3' 端とする。矢印の途中に入る該矢印への短い垂線は、塩基配列の区切りを示す部分である。また、図中の矢印の近くに示す、「a」、「A」および「DCN」等のアルファベットは配列の名前を示す。また、「a」、「A」および「DCN」等のアルファベットに付された添え字「i」および「k」は整数であり、それぞれの配列が、どの遺伝子に対応するかを表示するために付されたものである。ここでは「i」および「k」により任意の配列が示される。また、ここでは便宜的に「i」は発現遺伝子を、「k」は非発現遺伝子を示す。また、図中、配列名の上に線が引かれている場合は、相補的な配列を示す。図中の斜線のある円はビオチン分子を示し、白い大きい円は磁気ビーズを現す。磁気ビーズから右横に伸びる黒い十字は、該磁気ビーズに固定されたビオチン分子

と特異的に結合するストレプトアビジン分子を模式的に示している。

a. 「標的が存在する」という情報の「存在分子」への変換

標的が存在する場合の存在分子への変換は図 1 から 19 に示す工程を逐次的に行うことにより実施される。

5 まず、図 1 を参照されたい。上述の通り合成した  $a_i$  および  $A_i$  を、Taq ライゲースのような高温で活性の高い酵素の反応バッファ中で cDNA と反応させる。但し、このライゲーション反応の温度は  $A_i$  オリゴヌクレオチドの 2 本鎖部分が解離しない温度とする。この反応の結果、標的が存在した場合は、図 10 2 のようにライゲースにより  $a_i$  と  $A_i$  は連結される。次に、この反応溶液から図 3 に示すようにストレプトアビジンを表面に結合した磁気ビーズにて前記連結オリゴヌクレオチドを抽出する。このとき、未反応の  $a_i$  分子もビーズに捕獲されるが、以後の反応には関係しない。

20 続いて、熱をかけることで、磁気ビーズで捕獲した  $A_i$  と  $a_i$  の連結分子から  $A_i$  部分の相補鎖を分離抽出する（図 4）。この操作によって、最初の溶液に cDNA が存在していれば、それに対応する  $DCN_i$  配列に相補的な配列を含んだオリゴヌクレオチドが抽出される（図 4）。この抽出オリゴヌクレオチドをテンプレートとして、5' 端にビオチン標識をした SD 配列と同じプライマーと、ED 配列に相補的なプライマーにて図 5 のように PCR 増幅反応を行う（図 5）。これにより存在していると判明した遺伝子を検出する  $DCN_i$  配列が増幅される。

25 この PCR 増幅による 2 本鎖の産物を、図 6 に示すようにストレプトアビジン結合磁気ビーズにより捕獲する（図 6）。捕獲した 2 本鎖の PCR 産物を捕獲したままで熱をかけて 1 本鎖にし、解離させた相補鎖を緩衝液交換により除去する（図 7）。続いて図 8 のように、 $DCN_i$  に相補的な配列をもつ存在オリゴヌクレオチドを、ビーズに捕獲された PCR 産物にハイブリダイズする（図 8）。このハイブリダイゼーションの後、過剰な存在オリゴヌクレオチドを除去し、続いて、改めて熱をかけることによってビーズに捕獲されている  $DCN_i$  の相補鎖（即ち、存在オリゴヌクレオチド 3）をバッファ中に抽出する。ここで抽出された  $DCN_i$  に相補的な塩基配列を有する存在オリゴヌクレオチド 3 が、もとの cDNA 溶液中に標的遺伝子が存在することを示す存在分子で

ある。

b. 「標的が存在しない」という情報の「不存在分子」への変換

上述の工程により、存在した標的遺伝子を、それが存在するという情報を示す存在分子（即ち、存在オリゴヌクレオチド）に変換した後で、存在しないという情報をこれを示す分子（即ち、不存在オリゴヌクレオチド）に変換する。  
5 標的が存在しない場合には、存在しなかったことを示す不存在オリゴヌクレオチドが抽出される。この抽出は以下の通りに実施される。

予め、図9にあるような有無変換オリゴヌクレオチドを全ての検出対象の遺伝子のDCNについて準備する。上述した通り、有無変換オリゴヌクレオチドは、DCN<sub>i</sub>に対応するように人工的に設計され、且つDCN<sub>i</sub>とは異なる配列を有した塩基配列DCN<sub>i</sub>\*を5'端側に具備し且つ3'端側に隣接してDCN<sub>i</sub>配列を具えたオリゴヌクレオチドである。このような有無変換オリゴヌクレオチドと存在分子とのハイブリダイゼーション反応を利用することにより、「存在しない標的」を検出可能な「不在分子」に変換することが可能である。

まず、図9に示す工程において、有無変換オリゴヌクレオチド4に対して、図32の過程で抽出した発現遺伝子に対応するDCN<sub>i</sub>の存在オリゴヌクレオチド33をハイブリダイズし、ポリメラーゼにより伸長反応を行う（図9）。その結果、発現遺伝子のDCN<sub>i</sub>は伸長し、DCN<sub>i</sub>\*の配列の部分まで相補鎖が合成される（図9）。一方、図10の通り、標的分子が非発現遺伝子（ここ20ではDCN<sub>k</sub>と示す）であった場合、DCN<sub>k</sub>に相補的なオリゴヌクレオチドは反応液中に存在しないため、有無変換オリゴヌクレオチド5は1本鎖のままで存在する（図10）。これら2本鎖と1本鎖の混合物は、ヒドロキシアパタイトを含むカラムに通すことで1本鎖の有無変換オリゴヌクレオチド5のみを抽出することができる（図11）。

25 このように抽出した非発現遺伝子に対応するDCN<sub>k</sub>をもつ有無変換オリゴヌクレオチド5を、ストレプトアビジンを結合した磁気ビーズに捕獲する（図12）。次に、上述した存在オリゴヌクレオチド3のみの抽出と同様に、DCN<sub>k</sub>\*に相補的なオリゴヌクレオチド6をハイブリダイゼーションし、過剰なオリゴヌクレオチドを除去して非発現遺伝子を示すDCN<sub>k</sub>\*にハイブリダイゼーションした不存在オリゴヌクレオチド6のみを抽出することができる（図12）。

)。

不存在オリゴヌクレオチド6を得るための工程は以下のようにも実施できる。即ち、 $DCN_i$ オリゴヌクレオチドの5'端にFITCなどの蛍光分子を標識しておき、 $DCN_i$ に相補的な配列を有するプローブを含むDNAマイクロアレイにおいてハイブリダイゼーション反応を行う。これをスキャナなどで読み取り、どの $DCN_i$ が存在するかを検出する。このとき同時に、これにより存在していない $DCN_k$ もわかる。従って、これらのデータから、次の演算のために $DCN_k^*$ なる不存在オリゴヌクレオチド6を準備する。以上により存在しない核酸をその核酸に対応する不存在を示す核酸に変換することが達成される。これにより演算用核酸上での論理演算が可能になる。

また、この不存在オリゴヌクレオチド6を作る工程において、1本鎖の有無変換オリゴヌクレオチド5を鋳型として不存在オリゴヌクレオチド6を増幅してもよい。増幅は、例えば、図17から22に示される各工程を経て実施することが可能である。ここで、図17から22は、それぞれの工程を示すものであり、且つ各系に存在する分子を模式的に示したものである。各図中に示される記号等の詳細は上述した通りである。まず、図11の工程に従って、抽出された1本鎖のままの有無変換オリゴヌクレオチド5を得る(図11)。この有無変換オリゴヌクレオチド5に対して、図17に示すような、3'端側でSDに相補的な配列と、且つ5'端側でED配列に相補的な配列と結合した $DCN_k^*$ に相補的な配列を有したオリゴヌクレオチド7をハイブリダイゼーションすることで不存在オリゴヌクレオチド6を抽出する。続いて、図18から22に示すような工程により、存在オリゴヌクレオチド3と同様に増幅した $DCN_k^*$ を得ることができる。即ち、図18に示す工程で、図17の工程において得たオリゴヌクレオチド7に対してビオチン標識したSD配列を有するプライマー1と、ED配列に相補的な配列を有するプライマー2を用いてPCR増幅する(図18)。次に、PCR産物をビオチンをストレプトアビジン分子に結合することにより回収する(図19)。続いて、熱変性により、PCR産物を1本鎖にする(図20)。続いて、 $DCN_k^*$ に相補的な配列をもつ不存在オリゴヌクレオチドを、ビーズに捕獲されたPCR産物にハイブリダイズする(図21)。このハイブリダイゼーションの後、過剰な存在オリゴヌクレオチドを除去

し、続いて、改めて熱をかけることによってビーズに捕獲されている  $DCN_k^*$  の相補鎖（即ち、不存在オリゴヌクレオチド6）をバッファ中に抽出する。ここで抽出された  $DCN_k^*$  に相補的な塩基配列を有する不存在オリゴヌクレオチド6が、即ち、もとのcDNA溶液中に標的遺伝子が存在しないことを示す不存在分子である。

### (1. 3) 演算工程

演算工程では、上述で得られた存在分子および不存在分子と、以下に説明する演算用核酸とのハイブリダイゼーションおよび相補鎖合成を行い、それによって、所望する条件を現す演算式を解き、該条件を満たす解を求める並列計算を行う。

演算の例として演算式として式1を用いる。ある特定の配列  $DCN_1$ 、  $DCN_2$ 、  $DCN_3$  および  $DCN_4$  を標的配列とし、その有無の条件について論理式として示した式1を、演算用核酸と存在分子および不存在分子とのハイブリダイゼーション反応と伸長によって、演算し、値を評価する。式1は、  $DCN_1$ 、  $DCN_2$ 、  $DCN_3$  および  $DCN_4$  についての所望する有無についての組合せを所望の条件として示している。即ち、本例では式1の解を求めるということは、あるサンプル中における複数の標的配列の有無を同時に評価することである。

式1

$$(DCN_1 \wedge \neg DCN_2) \vee (\neg DCN_3 \wedge DCN_4)$$

式中、「 $\neg$ 」は「否定」、「 $\wedge$ 」は「論理積」、  
「 $\vee$ 」は「論理和」を表す記号である。

演算用核酸に設定した条件を満たす場合は、当該式の値は「1」、即ち「真」となる。また、演算用核酸に設定した条件が満たされない場合は、当該式の値は「0」、即ち「偽」となる。

図13に示すのが演算用核酸8の配列構造である。演算用核酸は1本鎖のオリゴヌクレオチドであり、図では矢印で示している。矢印の向きは5'端から3'端に向かっている。5'端にはビオチン分子が付いている。演算用核酸は複数のユニットを含む。その塩基配列は、5'端から順に、マーカー分子が結合する  $M_1$ 、  $DCN_1$  が存在しないときに得られるオリゴヌクレオチドを検出す

る配列  $DCN_1^*$ 、 $DCN_2$ 、ポリメラーゼによる相補鎖伸長が止まるような配列を具えたストップ配列  $S$ 、2つ目のマーカーが付く  $M_2$ 、 $DCN_3$ 、 $DCN_4^*$  である。この演算用核酸の配列は、論理式の各項の並びにほぼ対応する。論理式の「否定」もそのままの配列となる。例えば、「 $DCN_4$ 」配列の存在が  
5 「否定」される場合には、「 $DCN_4^*$ 」の配列を用いる。ここで、 $DCN_4^*$  は上述した通りの  $DCN_4$  の対応するように設計された人工的な配列である。また、「論理和」記号は  $S$  配列に置き換えればよい。「論理積」は演算用核酸  
10 上の配列として置き換える必要はない。式 1 のための演算用核酸の演算は、表 1 の各条件を満たすときに、その値が 1 になる。表 1 中「—」はどのような状態でもよいことを示す。

表 1

$DCN_1$	$DCN_2$	$DCN_3$	$DCN_4$	式の値
発現	非発現	—	—	1
—	—	非発現	発現	1

以下、論理式を評価する核酸反応について、その工程を説明する。演算工程は図 14 から 16 の工程を含み、演算反応は次の手順で行う。先に述べた論理式の演算を行うときには、図 13 に挙げた配列を具備した演算用核酸を準備する。1 つのチューブに対して 1 種類の演算用核酸を入れ、それに先の工程で得た存在オリゴヌクレオチドと不存在オリゴヌクレオチドを含む溶液を入れ、ハイブリダイゼーション反応を行う（図 14）。ここで、仮に、 $DCN_1$ 、 $DCN_3$ 、 $DCN_4$  が存在し、 $DCN_2$  が不存在であるならば、演算用核酸にハイブリダイゼーションするのは  $DCN_3$  のみである（図 14）。また、ハイブリダイゼーション反応後、 $Taq$  ポリメラーゼなど高温でも活性のある酵素により、ミスハイブリダイゼーションがおきない条件下で伸長反応を行うと、図 15 のように  $M_2$  配列部分は 2 本鎖となり  $S$  配列で伸長が止まる（図 15）。

25 次に、ストレプトアビジン磁気ビーズにより反応が終了した演算用核酸を捕獲する（図 16）。最後に、検出反応としてマーカーオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション反応を行う（図 16）。図 16 では、担体上に固定され

た演算用核酸を示しており、その5' 端のビオチン分子は担体上にあるストレプトアビジン分子に結合している。さらにマーカー検出配列に相補的な配列をもつマーカオリゴヌクレオチド $M_1$ 、 $M_2$ を準備する。これらマーカオリゴヌクレオチドの5' 端には蛍光を発する分子が付いている。この例では、演算用核酸の $M_1$ 配列は2本鎖化されていないので、当該マーカーは演算用核酸に結合することが可能である（図16）。このあと、結合していないマーカーを除去してビーズを蛍光観察すれば、マーカオリゴヌクレオチド $M_1$ がハイブリダイゼーションして蛍光を発するため演算結果得られる論理式の値は「1」であることが分かる。

上述では、S配列をストッパーとして使用したが、S配列を必ずしも配置する必要はない。その代わりとしてS配列をなくし、相補鎖が形成されないように設計した人工的な塩基を具えたヌクレオチドを含ませてもよい。このとき、演算用核酸をS配列の両側に配置すればよい。例えば、S配列は、他の配列部分にシトシン塩基が含まれないように設計し、S配列の塩基配列にシトシン塩基が含まれるように設計してもよい。この場合、後述の図15に示す演算用核酸上での伸長反応の際にモノマーとしてdGTPを別途加えなければ伸長反応はS配列上で停止する。また或いは、ポリメラーゼが伸長反応を停止し易いグアニンやシトシンの連続した塩基配列としてもストッパーとしての目的を達成できる。或いは、S配列に相補的なPNAを演算用核酸にハイブリダイゼーションさせておいてもよい。この場合、DNAとDNAのハイブリッドよりも、DNAとPNAのハイブリッドは安定であるため、5' エクソヌクレアーゼ活性のあるポリメラーゼであっても除去することはできない。従って、S配列がストッパーとして機能する。

また、マーカオリゴヌクレオチドの蛍光標識の種類を増やしてもよい。現在は、数多くの蛍光色素が開発されており異なる核酸に異なる蛍光色素を標識することが可能である。そのようにすれば、同時に多くの演算用核酸を標識することができる。例えば、この実施の形態において、 $M_1$ マーカオリゴヌクレオチドと $M_2$ マーカオリゴヌクレオチドとの間で蛍光分子を変えれば、検出した際にに論理式の括弧で囲まれたどちらの条件が充足されたのかが判明する。また、演算用核酸毎にマーカ配列を変え、マーカオリゴヌクレオチド

に標識する蛍光分子も変えれば、1つのチューブに複数種類の演算用核酸を入れて同時に演算反応をすることもできる。更にまた、蛍光強度は演算核酸の表現する論理式の充足度に比例するので、その大きさを知ることも可能である。

5 また、演算結果を得るに当たって、次のようなこともできる。即ち、この実施の形態における存在オリゴヌクレオチドと不存在オリゴヌクレオチドを増幅する工程において、P C R反応を増幅が飽和するよう十分なサイクル数行えば、「存在」を「1」、「不存在」を「0」とする2値の論理演算が可能である。一方、P C R反応を増幅を飽和させず、元のc D N Aの存在量に比例した量だけ得られるようにサイクル数を抑えれば、論理式を区間〔0, 1〕で確率的に評価することができる。例えば、発現遺伝子の場合は発現量に応じた結果が得られ、ゲノム配列であれば、ヘテロ接合かホモ接合かの違いを演算結果で知ることができる。

さらに演算用核酸をD N Aマイクロアレイのように、基板上に微小スポット状に固定し、その場所と演算用核酸の論理式が対応するようにアドレシングしておいてもよい。このようにしたときはマーカーオリゴヌクレオチドには蛍光標識をしておくのが好ましい。先に述べた演算反応をマイクロアレイ上の演算用核酸で行うと、D N Aマイクロアレイの読みとり用スキャナで演算結果を読みとることができる。

また、このマーカーオリゴヌクレオチドにビオチン分子を標識していてよい。このとき、演算用核酸の5'端にはビオチンを付けず、3'端、5'端にクローニングのための制限酵素認識配列を含むものにする。さらに反応においては図16に示すような演算用核酸をストレプトアビシン磁気ビーズにより捕獲する工程を行わない。この場合の検出反応はマーカーオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション反応した後で、ストレプトアビシン磁気ビーズによって演算用核酸をハイブリダイズしたマーカーオリゴヌクレオチドもそうでないものも両方とも捕獲し、捕獲された演算用核酸をクローニングし、シーケンサーで塩基配列を読み取る。それにより演算結果が「1」となる演算用核酸を確認することができる。このようにすれば1つのチューブに複数種の演算用核酸を入れて反応を行うことができる。

30 ここでは、4つの標的配列を用いた例を用いたが、更に多くの標的配列を対

象とすることも可能である。また、ここでは、ビオチンとストレプトアビシンを回収を行うためのタグとして使用したが、これに限られるものではなく、タグとこれに対して高親和性を有するものであればどのような物質を使用してもよい。

5 2. 第2の実施の形態

本発明の好ましい態様に従うと、上述した方法において、D C N配列として正規直交化配列を用いてもよい。「正規直交化配列」とは人工的に設計した塩基配列であって、「正規」とは融解温度 ( $T_m$ ) が揃っていることを示し、「直交化」とはミスハイブリダイゼーションが起きず、自己分子内で安定な構造をとらないということを意味する。

例えば、15塩基の正規直交化配列を求めるには、任意の5塩基をランダムに生成する。これら短い塩基配列を「タブル」と呼ぶことにする。5塩基長のタブルは  $4^5 = 1024$  種類ある。これらタブルの中から3つを選んで連結し15塩基を構成する。この連結に用いたタブルに相補的なタブルは以降の連結には用いない。ここで、これらを連結した15塩基の配列の  $T_m$  が  $\pm 3^\circ\text{C}$  以内に揃うような15塩基のセットを作る。また、自己分子内で安定な構造を取るかどうかも計算し、安定な構造をなすならばそのような15塩基は排除する。

最後に全ての配列同士で互いに安定な2本鎖を形成しないかを検証する。以上の方法で生成した15塩基の配列は反応温度を適切に選べば互いにハイブリッドを形成せず、混在しても独立したハイブリダイゼーション反応をするのでより好ましい。これら正規直交化配列を特定の遺伝子塩基配列と対応関係を持つように核酸  $a_i$  と  $A_i$  の配列を選び第1の実施の形態に従って反応を行えば、反応条件がより簡単になり、しかもより正確な演算反応を行うことが可能である。

25 3. 第3の実施の形態

続いて、本発明の好ましい態様に従うと、複数の遺伝子座にそれぞれ特定の塩基配列が存在することで決まるような遺伝子型を判定するためにも使用できる。ここでは、そのような遺伝子型を判定する方法の例を示す。

30 遺伝子型に対応する論理式を設定し、その論理式に基づき演算用核酸を設計

5

する。それにより、電子計算機や判定表を用いずに遺伝子型を判定することができる。具体的には、例えば遺伝子座1で塩基A、遺伝子座2で塩基T、遺伝子座3で塩基Gであるとき遺伝子型Aと判定でき、また、遺伝子座1で塩基A、遺伝子座2で塩基C、遺伝子座3で塩基Tであるとき遺伝子型Bであり、また、遺伝子座1で塩基A、遺伝子座2で塩基C、遺伝子座3で配列Gであるとき遺伝子型Cと判定できるならば、それぞれを満たす論理式は表2の右端欄に示す通りになる。

表2

	遺伝子座1	遺伝子座2	遺伝子座3	満たすべき論理式
遺伝子型A	A	T	G	$A \wedge T \wedge G$
遺伝子型B	A	C	T	$A \wedge C \wedge T$
遺伝子型C	A	C	G	$A \wedge C \wedge G$

遺伝子型判定はそれぞれの論理式と対応する演算用核酸により演算反応を行う。先ず、式の各要素について遺伝子座に特定の配列が存在する場合の値を1とし不存在の時を0とし、最終的に式全体の値が1となる式があるならば、その式に対応する遺伝子型が判定結果となる。このような核酸を用いた演算による本発明の方法により、遺伝子座が多くあり且つ遺伝子型は極少ないような遺伝子の型判定が、複雑な表や電子計算機を必要としない簡便なものとなる。

#### 4. 第4の実施の形態

20

更に、本発明の好ましい態様に従うと、上述の方法は、癌細胞の遺伝子発現において各種遺伝子がどのような発現、非発現の条件（即ち、状態）下にあるかのを調べることにも利用できる。上述した第1の実施の形態に対すると、第3の実施の形態は、所謂「逆問題」とも呼ぶことも可能である。

25

予め、様々な論理式を表す演算用核酸を準備する。この演算用核酸は、5'端をリン酸化した各種の論理式要素、すなわち $D C N_i$ 、 $D C N_i^*$ 、S、M等からなる配列を有する。これらに加えて、例えば、図22に示すような論理式要素を連結するための連結用相補核酸9を準備する。連結用相補核酸9の配列は、連結を所望する仕切部分に隣接して存在する2つの部分の配列に相補的な配列を有すればよい。

これら核酸をハイブリダイゼーションし、ライゲースで連結反応すれば任意に論理式要素が結合された演算用核酸が得られる。連結用相補核酸の配列を十分考慮して設計することで論理式として不適当なものが生成されないようにできる。

この演算用核酸を用いて逆問題を解くには、癌細胞から取得した c DNA を第 1 の実施の形態にしたがって、論理式要素の配列に変換し、あらかじめ準備しておいた様々な論理式を表す演算用核酸により論理演算を行う。最後にこれら演算用核酸が表現する論理式のうち、満たされるものがあるかどうかを検出する。このうち、論理式の値が 1 となった演算用核酸の意味する内容を解釈することによって、どのような遺伝子の発現、非発現状態が満たされる条件にあるのかを解明することが可能である。或いは少なくともその部分条件を解明することが可能である。

任意に作製した演算用核酸の配列を同定するには、先ず、1 つの容器において反応する。次に、第 1 の実施の形態のビオチン分子を結合したマーカーオリゴヌクレオチドにてストレプトアビジン磁気ビーズに演算用核酸を回収する。続いて、シーケンシングを行い、演算分子の内容を読みとる方法で論理式を読み取ることが好ましい。また、任意に演算用核酸を作製せずとも、論理式を決めて連結により演算用核酸を合成する方法でおこなってもよい。この場合には、それら論理式を DNA マイクロアレイにアドレシングして固定し、検出時に論理式を確認してもよい。または、1 つの容器に 1 種類の演算用核酸を入れて反応を行っても良い。

これらの結果を正常細胞と比較すれば、未知のゲノム塩基配列の組み合わせにより生ずる遺伝病や、未知の遺伝子発現の組み合わせによって生ずる遺伝子異常による癌などの疾病的原因遺伝子を容易に特定することができる。

## 5. 考察

従来の技術には、特定の核酸が存在しないことを核酸表現に変換できる技術はなく、また、そのような思想すらない。例えば、m RNA の発現状態を検出するには DNA マイクロアレイがよく用いられている。このマイクロアレイには既知の遺伝子塩基配列をもとに設計したオリゴ DNA 、またはあらかじめ取得した c DNA をプローブとしてスライドガラス上にアレイ状に固定している

。このマイクロアレイで発現を検出するには、mRNAから蛍光標識したcDNAを作製し、マイクロアレイのプローブと該cDNAとをハイブリダイゼーション反応をさせ、特定の配列のプローブを固定した場所に特定の標識したcDNAが結合して光ることで検出する。ところが、発現していないmRNAからは標識cDNAが作製できないので、遺伝子が発現していないことを検出できない。すなわち、実験中にmRNAが失われたり、遺伝子が発現しているにもかかわらず生成される蛍光標識cDNAが少ないために不存在であると判定されることがある。このような従来の方法とは異なり、本発明の1態様に従うと、不在の核酸の情報を可視化することが可能である。

また、遺伝子核酸を反応させると、数多くの遺伝子が混在した状態では思われぬ核酸同士がハイブリッドを形成して反応することがある。また、塩基配列に含まれるグアニンやシトシンなどの塩基の数は2本鎖核酸の構造を安定化する。このような塩基が、取り扱う遺伝子核酸毎にまちまちであれば、ハイブリッドを形成する最適な温度が異なる。そのため、全ての核酸がミスマッチのない、適切なハイブリッドを形成できるとは限らない。また、自己分子内で構造をとり、標的配列との反応性が低くなるような塩基配列をもつ核酸が混在している場合には、理論的に予想される反応が進まないこともあり得る。このような従来の方法に比較して、本発明の態様に従う方法では、情報を、好ましい条件で設計した核酸分子に、置き換えてから、反応に使用するので、安定した反応を行うことが可能である。

また、化学発光など酵素を用いた検出法は高感度であるが、検出のための処理が面倒で時間がかかる。更に、1チューブ内で複数の種類の化学発光を行うことは難しい。また、演算用核酸を用いて演算した場合、その結果を見るのに单一の発色もしくは発光反応では1チューブで1種類の演算用核酸しか反応できない。これに対して、本発明の態様に従えば、感度よく、多数の標的核酸を同時に感度よく検出することが可能である。

また、従来の方法では、核酸の存在条件のみに基づいて作った論理式が演算用核酸に書き換えられている。ところがおよそ世の中に存在する問題は所謂「逆問題」である。例えば遺伝病における各遺伝子の発現状態について調べたとき、どのような遺伝子核酸の存在、不存在の条件が満たされれば病気になるの

かが問題である。従って、遺伝子核酸の存在および不存在の論理式を求めることが問題なのである。従来では、このような問題は、DNAマイクロアレイのデータを大型計算機によりクラスタ解析して解いていた。従って、非常に多くの時間と費用とが必要とされていた。本発明の態様に従うと、短時間に、且つ経済的にそのような問題を解くことが可能である。

ここでは、特に、遺伝子解析のための方法を示したが、本発明は、その範囲を超えることなく種々の並列計算による情報処理を行うことが可能である。即ち、遺伝子解析以外の情報の、例えば、数学的な問題を並列処理を行って解く場合においても、優れた利点を得られる当業者には容易に理解されるであろう。

## I I. 分子計算装置

### 1. 概要

本発明の好ましい態様に従うと、上述の情報処理方法を実行するための計算装置が提供される。そのような計算装置は、電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置であって、前記電子計算部が、実質的に分子計算部の機能を制御し、その制御の基で分子による演算が実施される分子計算装置である。

本発明の計算装置において基礎となる計算法は、上述したような分子演算の並列性を利用して演算を行い、得られたデータを基に、従来の電子コンピュータによって高速に論理式を評価する方法である。本発明は、このような核酸分子を用いて計算を実施することによって、データの並列処理や遺伝子解析を有利に行う計算装置を開示する。また、核酸分子によりデータやプログラムを表現し、その分子反応で命令を実行することにより、従来の電子コンピュータに比べて桁違いに大きなメモリ容量と高い並列処理能力を実現することを可能とする。

本計算装置を開発するに当たり、まず最初に、本発明者らは、分子計算機を用いて演算を実行するときの計算プログラムの内容を、分子計算部で認識することが可能で、且つ実行することが可能なデータ形式に変更しなければならないことに注目した。即ち、分子計算部で計算を実施する前に、分子を特定の符号に結びつけた符号分子に変換し、それを用いて計算プログラム中の変数および定数などのデータを自動的に符号分子に変換しておくことが好ましいことを見

出した。更に、このような変換操作は、電子計算部において行うことが計算速度の向上のために好ましいことを見出した。

言い換えれば、本発明の分子計算装置は、分子計算部と電子計算部とが互いに補完的に機能を分担する計算装置である。従って、使い勝手がよく、その上、速い速度でNP完全問題を解くことが可能である。即ち、本発明の計算装置は、分子計算部の欠点、即ち、文字の入力や表示、単純な四則計算が遅いという欠点を、電子計算部を用いてカバーすることによって速度向上を可能にした。従って、本発明の分子計算装置は、電子計算機が高速に実現できる機能は電子計算部が担当し、それ以外の部分を分子計算部が担当するハイブリッド分子計算装置である。

本発明の基本となる計算装置を図25に示す。本発明の計算装置は、電子計算部21、電子計算部への入力部11および出力部20、並びに分子計算部22、分子計算部への入力部18および出力部19を具備する。更に、電子計算部21は、少なくとも、演算部14、記憶部13および入出力制御部2を具備し、更に、その他の一般的な電子コンピュータの構成要素を具備してもよい。分子計算部22は、演算部15、記憶部16および入出力制御部17を具備する。ただし、演算部15と記憶部16は実体としては分子や実験用部材であり演算とデータの記憶を同時に実現している。

本発明の計算装置において、基本的に、電子計算部21は、該分子計算部22を制御する部分である。電子計算部21に所望するプログラムが入力されると、入力された情報を基に、分子計算部22において実行する分子計算の計画が作製され、また、目的とする分子計算に必要な分子の設計が行われ、それにより得られた情報を分子計算部22に伝え、分子計算部22における分子計算を行う。例えば、当該分子計算の計画は、記憶部13に記憶された入力情報と設計される分子計算が対応されたテーブルを演算部14、例えば、CPU等が検索し、対応する計算を選択することによりなさてもよい。また、分子の設計は、記憶部13に記憶された入力情報と設計される分子が対応されたテーブルを、演算部14、例えば、CPU等が検索し、対応する分子を選択することによりなさてもよい。

更に、分子計算部22において得られた計算の出力は、電子計算部21に戻

り、演算部 14 やその他の任意に具備される処理手段により所望の処理が施されてもよい。例えば、それらの結果は、予め入力され、記憶部 13 に記憶しておいた処理形式に応じた形式で集計および演算処理され、最終的に出力部 19 または出力部 20 に所望する形態で出力される。これらの処理の間、分子計算部の演算部や記憶部の状態は、電子計算部において入出力制御部を通じて間接的に把握されている。この様子を図 25 では点線で示している。

一方、分子計算部 22 は、実験的に核酸分子を合成したり、合成された核酸分子を用いて所望する演算反応を行うことにより分子計算を実行する部分である。また、分子計算部 22 において行われる分子計算の例は後述する。

電子計算部 21 の演算部 14 は、入力部 11 から入力された初期値を符号分子表現に変換すること、計算プログラムの手続きや関数を対応する符号分子の演算反応に変換すること、および記憶された計算プログラムから演算反応の実行手順を作製すること等を行う。また、電子計算部 21 にて制御されることは、例えば、分子の変数への割り当て、実験容器の割り当て、実験中の実験用部材（例えば、ピペットチップなど）や試薬の配置の割り当て、コンテナやピペットなどの実験器具の移動や操作の割り当て、サーマルサイクルの温度制御の設定、並びに実験の実行シーケンスの決定などである。

基本的な計算装置の処理を図 26 の処理フローに従って説明する。（S1）所望する計算プログラムは、電子計算部 21 の入力部 11 から入力され、入力された計算プログラム、計算プログラムの定数および変数等の情報は記憶部 13 に記憶される。（S2）演算部 14 において、S1 で記憶されたそれぞれの初期値は演算部 14 により記憶部 13 に予め記憶された対応データに従って、符号分子表現に変換される。前記計算プログラムの手続き関数は、対応する符号分子の演算反応に変換される。更に、記憶部 13 に記憶された計算プログラムに従って、演算反応の実行手順が作製される。ここで、S2 に含まれる工程をそれぞれの変換処理を「プログラムの翻訳」と称し、実行手順の製作を「実験計画の立案」とも称す。（S3）続いて、演算部 14 において、S2 の工程において得られた符号分子から実際に使用する核酸配列を設計する。この処理は、予め設計しておいた核酸配列を用いるならば行わなくてもよい。（S4）以上の電子計算部 21 において得られた情報は、分子計算部 22 に送られ、S3

において設計された各配列を有した核酸である符号分子が合成される。核酸の合成は演算部 15において行われる。核酸合成に必要な材料は、入力部 18から供給される。もし、予め設計し合成しておいた核酸を用いるならばこの合成は必要なく、入力部 18から合成済みの核酸を入力する。(S 5) 続いて、S 2において得られた実行手順に従って、S 4において準備された演算分子を用いて、プログラムに応じた演算反応を実行する。(S 6) S 5において行われた演算反応により生じた反応産物を検出および同定を行うことにより、反応産物の解析を行う。(S 7) S 6で得られた反応産物の情報は、電子計算部 21 に送られる。電子計算部 21 には、予め情報処理プログラムが記憶されているので、当該情報処理プログラムを呼び出し、それに従って分子計算部 22 から得た反応産物の情報を処理し、最終データを算出する。(S 8) 予め記憶部 13 に記憶しておいた出力形式に合わせるように、S 7において算出された最終データが処理され、出力部 20 から出力される。

このような工程は、所望に応じて互いにループを形成することも可能である。例えば、各工程により得られた結果を、記憶部 13 に予め記憶された条件等と比較し、その比較結果によってはそれ以前の何れかの工程を単独で、または複数の工程を組み合わせて実施することを、繰り返して行うように設定することも可能である。

また、どうしても自動化が難しい場合や、自動化すると装置が大がかりになる場合、例えば、クローニングにおける培養やコロニーピッキングなど人力で行なうことが好ましい実験操作を行うときには、一度出力部 19 に核酸を出力し、出力部 20 に行なうべき実験操作を表示する。この後、人力による実験操作を行ってから再び入力部 18 に核酸を入力し、入力部 11 から再起動を入力する、または入力を自動的に検出することで計算を再び始めてもよい。

また、この工程において計算プログラムが所望の分子を得ることを目的とし、計算結果を表示する必要がない場合、S 5 で得られた所望の分子を最終出力とし、S 6 から S 7 を実行せず、S 8 で計算の終了を表示してもよい。例えば、特定の遺伝子を特異的に検出するオリゴDNAを選択する計算を実行した場合などである。

S 2 の工程における符号分子への変換は、予め、記憶手段に記録しておいた

分子変換テーブルを読み出し、そこに含まれるデータを検索して対応するデータを読み出すことにより行うことが可能である。例えば、分子変換テーブルは、分子計算に使用する符号分子と、電子計算部に入力する情報を対応付けたものでよく、一般的に使用される対応表を電子データとしたものであればよい。

また、S 2 の工程における計算プログラムの手続きや関数の演算反応への変換は、予め、記憶手段に記録しておいた手順変換テーブルを読み出し、そこに含まれるデータを検索して対応するデータを読み出すことにより行うことが可能である。例えば、手順変換テーブルは、実際に行われる分子計算の工程、それを実施する順序および繰り返し回数等と、電子計算部に入力する情報を対応付けたものでよく、一般的に使用される対応表を電子データとしたものであればよい。

また、以上の各工程で得られた情報は、工程毎に全て記憶部 1 3 に記憶されても、少なくとも一部分が記憶されてもよい。

本計算装置における電子計算部への入力部は、例えば、キーボードおよびマウス等の一般的に人が情報を入力することが可能な入力手段の何れかを使用することが可能である。本装置の電子計算部への出力部は、ディスプレイおよびプリンタ等の一般的に情報を出力することが可能な出力手段の何れかを使用することが可能である。

また、上述の手順では、分子計算部 2 2 に具にされる演算部 1 5 において、核酸分子の合成を行うように記載したが、分子計算部 2 2 および電子計算部 2 1 に内包されず、しかし電子計算部 2 1 と分子計算部 2 2 とに連結して存在するような分子合成部として配置ことも可能である。また、分子計算部 2 2 における演算部 1 5 は、核酸分子を用いた演算反応を行うために必要な以下のような各部分を具備する。即ち、そこにおいて各種反応を行うための反応部、反応に必要な核酸を保持するための核酸保持部、反応に必要な試薬および緩衝液等を保持するための試薬保持部、反応に必要な酵素を保持するための酵素保持部、各部分を所望に応じて加熱するための加熱手段、各部分を所望に応じて冷却するための冷却手段、分注用ピペット等の分注手段、ピペットや反応容器等を洗浄するための洗浄手段、並びに各種操作を制御するための制御手段を全て、

またはその中の幾つかを組み合わせて具備することが可能である。

また、演算部 15 は、目的の演算反応により生じる反応産物を検出および同定するための検出手段を具備してもよい。しかしながら、検出部は、演算部 15 に必ずしも包含する必要はない。即ち、検出部は使用する検出手段によっては非常に大がかりな装置になる場合もあるので、電子計算部 21 および分子計算部 22 には内包されず、しかし、電子計算部 21 と分子計算部 22 とに連結して存在するような検出部として配置することも可能である。

例えば、本装置における検出は、演算反応により生じた反応産物を電気泳動し、そのピークの位置を検出することによって核酸分子の長さを判定して実施してもよい。または、反応産物を DNA シーケンサに供し、そこから出てくるデータを基に配列を検出して実験最初に割り当てていた符号化核酸の何れであるのかを判断してもよい。或いは、DNA マイクロアレイとスキャナを装備することにより、符号化核酸の配列をハイブリダイゼーション法により読み取ることにより実施してもよい。

また、上述の処理フローでは、検出した結果は電気計算部 11 に送られて、出力部 20 より出力されたが、上記したような分子計算部 22 における検出が行われた結果として得られる分子をそのまま生データとして得ることも可能である。

電子計算部 21 において、一連の実験の手順、即ち、実験シーケンスを計画するためには、入力されたプログラムと問題とその初期値とから、一意に実験シーケンスが定まることが必要である。例えば、3SAT のプログラムの場合では、プログラムのループを展開し、条件分岐については問題を参照して予め判断しておくことによって、実験計画を定めることができる。従って、プログラムの計算が始まる時点で全ての実験計画を定めることができる。ただし、プログラムによってはループの途中に配列検出操作を入れて配列を確認してから条件分岐を行わなくてはならない場合もある。その場合、検出操作を行ってからその結果に応じて次の段階の実験計画を立てるように実行すればよい。

また、本発明の計算装置では、実験操作、例えば、cDNA の合成などを関数化し、実験操作と関連づけて電子計算部に記憶させておくことが可能である。これにより自動的な手順の計画が可能となる。また、自動的に符号化反応を

行うことにより、それぞれの処理、例えば、論理演算および／または配列検索を自動的に並列的に行うことができる。

本発明によれば、従来の実験用、臨床用および製造用等の種々の作業用ロボットシステムを、事前に準備された電子計算部側のプログラムに制約されることはなく、目的を最優先とした作業計画に対応するように動作させることが可能となる。場合によって、ロボットシステムに最適な作業計画を自動的に組み立てるような設定も可能となる。

本発明における符号化配列として、例えば、ヒトの遺伝子を変換する場合には、ウイルスなど、異種で塩基配列のホモロジーが低い生物の部分配列を用いることが好ましい。また、単に 3SAT などの非生物的な問題を解く場合には、クロスハイブリダイゼーションしないように、且つ  $T_m$  がほぼ等しいような配列を任意に設計し、符号化配列として使用することも可能である。また、数が多く必要であれば、電子計算部 21において所望の条件を満たすように計算で求めた正規直交化配列を用いることがより好ましい。

また、分子を直接的な入力とした演算が可能になるので、例えば、遺伝子解析に本発明を利用した場合には、実験誤差を最小に抑えることが可能である。即ち、核酸を符号化核酸に変換して装置内で分子の状態のまま計算処理するので実験誤差が抑えられる。また、本発明の計算装置の使用により計算時間およびランニングコストが削減できる。更に、遺伝子解析をプログラミングにより表現することで、実験を自動的に計算して実行することもできる。また、発現遺伝子を符号化 OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) を行うことにより符号化核酸に変換し、符号化核酸の 3' と 5' 末端にある共通配列により PCR 増幅すれば、正確にそれらの発現比を検出することができる。符号化 OLA についての詳細は後述する。

## 2. 詳細な説明

### (1) 分子計算装置

以下に更に詳細に本発明を説明する。本発明の計算装置の例を図 27 に示す。図 27 に示した計算装置は、電子計算部と分子計算部と核酸合成装置からなり、これらは互いに連結されている。

まず、電子計算部における処理手順の例を説明する。まず、入力部から入力

された計算プログラムおよび初期値は記憶部に記憶される。或いは、記憶部に記憶される前に、翻訳・実験計画立案・実行部において、符号分子および符号分子の演算反応に変換され、且つ演算反応の実行手順が作製される。続いて記憶部に記憶される。次に、核酸配列計算部において、前述で得られた変換後の情報を基に演算分子が計算され設計される。これらの工程において扱われる情報は、常に結果出力部を経て表示部に表示されてもよい。或いは、所望する情報のみを随時表示されるように設定されてもよい。必要に応じてプリントアウトされてもよい。

核酸配列計算部において得られた演算分子等の分子計算に必要な核酸は、電子計算部の処理により得られた情報を基に核酸合成装置によって合成される。合成された核酸は、分子計算部の核酸容器に運ばれる。

一方、分子計算部および電子計算部には、電子計算部からの情報を受けたり、電子計算部へ情報を送るための通信部が具備される。通信部は、ケーブル等の有線の通信手段により達成されても、また、電波等の無線の通信手段によって達成されてもよい。

分子計算部には、そこにおいて反応を行うためのサーモバス反応容器と、そこにおいてビーズを保持するビーズ容器と、同様に酵素を保持する酵素容器と、緩衝液を保持する緩衝液容器と、核酸を保持する核酸容器とを具備する。これらは、ビーカー、試験管若しくはマイクロチューブ等の容器でよく、または一般的に使用される他の保持手段を用いることが可能である。

サーモバス反応容器は、温度調節の可能な反応容器でよく、例えば、一般的に使用されるサーモバスに反応容器を具備させることにより構成することが可能である。また、この例では、担体としてビーズを用いた場合の例を示したが、他の担体を用いることも可能である。その場合、ビーズ容器に代えてまたはビーズ容器に加えて、適切な構成要素を具備することが可能である。また、酵素容器は、酵素を失活から守るためにクーラー等の温度調節手段と共に具備されてもよい。また、必要であれば他の保持手段にもクーラーまたはヒーター等の温度調節手段を配置してもよい。

サーモバス反応容器における反応は、計算プログラムに沿って実施される。例えば、保持容器から所望する容量の内容物を X Y Z 制御ピペットにより分取

した後、所望する温度等の条件に従って反応が実施される。各部分における動きは、分子計算部内の自動制御部により制御される。自動制御部の動きは、電子計算部により制御される。ここで、XYZ制御ピペッタとは、自動制御部により制御されて、所望に応じてXYZ方向および／または上下に移動するピペッタをいう。

反応終了後、検出部において反応産物の検出および同定が実施される。検出部は、電気泳動装置、シークエンサー、化学発光測光器および蛍光光度計等の一般的に核酸分子を検出および解析するために使用される何れの検出手段または解析手段を使用してもよい。

本発明において、分子計算部は、ハイブリダイゼーション反応、酵素反応、抗原抗体反応のような生物学的特異反応の開始から終了までに関わる工程または手段を少なくとも含んでいるものとする。ここで、反応の開始時点は、早ければ反応対が有意に選択性を示すと認められる段階を少なくとも含み、遅くとも検出、分離等の目的が達成できる直前の時点を含んでいる。また、反応の終了時点は、早ければ検出、分離等の目的が達成できた最も早い時点を少なくとも含み、遅ければ検出、分離等の目的が充分に達成できる経過時間よりも長い時点を含むことができる。

図28に、本発明の分子計算部における各部の配置例を示す。例えば、分子計算部には、8本取りチップラック21、1本取りチップラック0番22、1本取りチップラック1番23、96穴マルチタイタープレート（以下、MTPと称す）2番24、96穴MTP0番25、1.5mLチューブラック26、96穴MTP1番27、サーマルサイクラー96穴MTP28およびチップ廃棄口29を配置することが可能である。しかしながら、これにより何ら制限されるものであり所望に応じて各種変更が可能である。

## （2）分子計算部における分子計算

本発明の1態様に従う、分子計算装置における分子計算部における分子計算は、上述した項目Iに記載した本発明の各態様であってよい。

最初に従来のエーデルマンーリップトンパラダイムに基付くDNA計算の問題点を説明する。エーデルマンーリップトンパラダイムに基付くDNA計算は、先ず、最初に全ての解の候補を表現するDNA分子のプールを生成する必要があ

5 ることが問題である。NP完全問題の解の候補数は変数の数に対して指数関数的に増大するものである。従って、問題のサイズが大きくなると、超大容量メモリを備えたDNAコンピュータでも全ての解の候補を含む完全なプールを生成できない危険性が生じる。これが、エーデルマンーリプトンパラダイムが内包する深刻なスケール問題である。

10 例え、代表的なNP完全問題である三和積形命題論理式の充足可能性問題(3SAT)を考えてみる。論理変数の数を100とすると、解の候補は $2^{100} = 1.3 \times 10^{30}$ にもなる。1変数を15塩基対のDNA分子で表現すると、完全なプローブを生成するためには少なくとも2万トンという非現実的な量のDNA分子が必要になる。1分子で一つの解の候補を表現したのでは計算反応の途中で失われてしまう危険性が高い。従って、実際にはより大量のDNA分子が必要である。変数の数が200になると、少なくとも地球の質量の約40兆倍ものDNA分子が必要となる。これでは実際に問題を解くことは不可能であると言わざるを得ない。

20 そのような状況において、発明者らは、ダイナミック・プログラミングに基づいたアルゴリズムを分子計算装置(DNAコンピュータとも称することができる)で実行することによりNP完全問題を解くことを考えた。即ち、エーデルマンーリプトンパラダイムのように最初から全ての解の候補を生成するのではなく、部分の問題の解の候補を生成してその中から解を選択抽出する。この操作を部分問題のサイズを逐次的に大きくしながら繰り返し、最終的に本来の問題の解を得るのである。このようにすれば、生成される解の候補の数を大幅に減らすことができる。

25 ここで、(1. 1) 準備の項目において記載した分子の設計は、計算プログラムから、電子計算部の翻訳・実験計画立案・実行部において必要な情報に変換された後に、核酸配列計算部において所望する条件に適切な核酸配列が設計される。また、前記の工程は、電子計算部の演算部において行うことも可能である。電子計算部において得られた情報に基づいて核酸が合成され、分子計算部において分子計算が実行される。

### (3) プログラム

30 NP完全問題の代表例である3SATは、例えば、次のようなプログラムに

従ってDNA計算を実行することにより、ダイナミックプログラミングのアルゴリズムに基付いて解くことができる。

### 数式2

5 Problem : 4 variables, 10 clauses

$$(x_1 \vee x_2 \vee \neg x_3) \wedge (x_1 \vee \neg x_2 \vee \neg x_3) \wedge (\neg x_1 \vee x_2 \vee x_3) \wedge (\neg x_1 \vee \neg x_2 \vee x_3) \wedge \\ (x_1 \vee x_3 \vee x_4) \wedge (\neg x_1 \vee x_2 \vee x_4) \wedge (\neg x_1 \vee \neg x_3 \vee x_4) \wedge (x_2 \vee \neg x_3 \vee \neg x_4) \wedge \\ (x_2 \vee x_3 \vee \neg x_4) \wedge (\neg x_2 \vee x_3 \vee \neg x_4)$$

ここで、記号の「 $\wedge$ 」は論理積、「 $\vee$ 」は論理和、「 $\neg$ 」は否定を表す。

### 数式3

Solution :

YES

$$\{x_1, x_2, x_3, x_4\} = \{1.1.1.1\}$$

本装置を用いて4変数10節の3SAT問題を解いた。解いた問題を数2に、問題の答を数3に示す。数2の問題の論理式は $x_1, x_2, x_3, x_4$ の4つの変数からなり、3ラテラルの節が10個、論理積で結合されている。この式を満たす変数の値の組、すなわち解が有るかどうか、有るならばその変数の値の組を求めるのが目的である。

#### 数式 4

```
function dna 3 sat (u1, v1, w1, u2, v2, w2, u3, v3, w3, ..., u10, v10, w10)
begin
    T2 = {X1TX2T, X1FX2T, X1TX2F, X1FX2F} ;
    for k = 3 to 4 do
        amplify (Tk-1, TwT, TwF) ;
        for j = 1 to 10 do
            if wj = xk then
                TwF = getuvsat (TwF, uj, vj) ;
            end
            if wj =  $\neg$ xk then
                TwT = getuvsat (TwT, uj, vj) ;
            end
        end
        TT = append (TwT, XkT, Xk-1T / F) ;      TF = append (TwF, XkF, Xk-1F / F) ;
        Tk = merge (TT, TF) ;
    end
    return detect (T4) ;
end

function getuvsat (T, u, v)
begin
    TuT = get (T, + XuT) ;      TuF = get (T, - XuT) ;
    TuF = get (TuF, + XuF) ; /* can be omitted */
    TvT = get (TuF, + XvT) ;
    TT = merge (TuT, TvT) ;
    return TT ;
end
```

この問題を解くために数式 4 に示す関数を本装置で実行する。記述法はパスカルに準じている。関数 dna 3 sat が問題を与えたときに解が存在した場合に解を出力するメイン関数である。この中には getuvsat 関数が組み込まれている。これら dna 3 sat と getuvsat は amplify、append、merge、detect の 4 つの基本関数で構成されている。それぞれの関数は図 29 から図 32 に示す DNA の反応により実行される。

10 次に各基本関数の反応を説明する。最初に、図 29 に従って get (T, + s)、get (T, - s) 関数について述べる。get 関数は、オリゴヌクレオチドの混合溶液 T (tube) から、s なる配列を含む 1 本鎖のオリゴヌクレオチドまたは該配列を含まないオリゴヌクレオチドを取得する関数である。ここで、s とは数塩基または数十塩基の特定の配列を示している。get (T, + s) は s 配列を含むオリゴヌクレオチドを、get (T, - s) は s を含まないものを取得する。最初、s に相補的な配列を持ち 5' 端ビオチンを標識したオリゴヌクレオチドを T に入れ、s 配列を備えたオリゴヌクレオチドとア

ニーリングさせる。

ここでできたハイブリッドを、例えば、ストレプトアビジンを表面に結合した磁気ビーズで捕獲する。このあと  $s$  配列に相補的なオリゴヌクレオチドのなすハイブリッドが解離しない温度で磁気ビーズの緩衝溶液で洗えば（即ち、コールドウォッシュ ; cold washすれば）、 $s$  配列を持たないオリゴヌクレオチドを緩衝液から取得でき、 $get(T, -s)$  が実行できる。

また、前記コールドウォッシュが終わってから、ハイブリッドが解離するような比較的高温の緩衝溶液で磁気ビーズを洗えば、その緩衝溶液から  $s$  配列を持つオリゴヌクレオチドを取得でき、 $get(T, +s)$  が実行できる。即ち、1つの操作で2つの関数が実行できるのである。

次に、図30に従って  $append(T, s, e)$  関数の反応について述べる。これはオリゴヌクレオチドの混合液  $T$  の中で  $e$  配列をその3' 端に備えた1本鎖DNAの3' 端に  $s$  なる配列を備えたオリゴヌクレオチドをライゲーションにより連結し、その  $s$  配列を連結された1本鎖のオリゴヌクレオチドを取得する関数である。ここで、 $s$ 、 $e$  とは先に述べたのと同様に数塩基若しくは数十塩基の特定の配列を指す。この反応では、次のオリゴヌクレオチドを用いる。 $s$  配列のオリゴヌクレオチドは、この5' 端がリン酸化されている。また、連結オリゴヌクレオチドは、5' 端にビオチン標識されており、5' 端側の  $s$  に相補的な配列と3' 端側の  $e$  に相補的な配列とを隣接して含有する。これらをチューブ  $T$  に入れて反応を始めると連結オリゴヌクレオチドは、 $T$  中の標的オリゴヌクレオチド配列  $e$  と  $s$  配列オリゴヌクレオチドとでハイブリッドを形成する。このハイブリダイゼーション反応は、ミスマッチのハイブリッドが形成されないように比較的高温で行い、 $Taq$  ライゲースなど高温で活性の高い酵素を用いて連結される。このあとストレプトアビジン磁気ビーズなどによりハイブリッドを捕獲し、ハイブリッドが解離するような高温で洗えば（即ち、ホットウォッシュ）、3' 末端に  $s$  配列が連結されたオリゴヌクレオチドを回収することができる。

次に図31に従って、 $ampify(T, T_1, \dots, T_n)$  関数の反応について述べる。これは反応溶液  $T$  に含まれるオリゴヌクレオチドをPCR反応により増幅し、増幅され二本鎖になったオリゴヌクレオチドを1本鎖に変え

てから、 $T_1, \dots, T_n$  なる  $n$  個の反応溶液に分割する反応である。本実施例では  $T$  に含まれるオリゴヌクレオチドの両端には共通な増幅用の配列が具備され、1組のプライマーにより全ての  $T$  中のオリゴヌクレオチドを増幅できるようしている。プライマーのうち、増幅対象のオリゴヌクレオチドの 3' 端に相補的な配列をもつものの 5' 端にはビオチン標識が施されている。 $T$  のオリゴヌクレオチドをこの共通プライマーにより増幅し、ストレプトアビジン磁気ビーズにより捕獲する。これを 94°C などの高温で全ての 2 本鎖が解離するよう洗浄すれば、もともと  $T$  に含まれていた側の鎖が緩衝溶液中に抽出できる。この抽出溶液を均等に  $T_1, \dots, T_n$  の  $n$  個の反応溶液に分割すればよい。

次に `merge` 関数は、引数の複数の溶液を 1 つの溶液に纏める操作を現す。

最後に `detect` 関数を図 3-2 に従って説明する。検出は、手動による反応で実施することも可能である。`detect` 関数を本装置により行う方法の例を以下に示す。ここでは `graduated PCR` なる、エーデルマンの論文 (Science, 266, 1021-4) において開示された検出手段を用いて行う例を示す。

図 3-2において、本装置で生成される解を示す核酸分子は、5' 端から順に 4 つの変数が真 (即ち、 $T$ 、`true`) または偽 (即ち、 $F$ 、`false`) を表す配列が連結した配列を有す。この解の配列は、同じく図 3-2 に示す全ての可能な解を検出できるようなプライマーにより個別に PCR 増幅する。図中、配列名の上に引いた横線は、相補配列を示す。仮に、図 3-2 の最初に示すような配列の解が得られていると、図 3-2 の最後に示すプライマーの組で、且つ図示した長さの PCR 産物が得られる。これら産物の存在と長さをゲル電気泳動にて確認すれば、PCR 産物の得られたプライマーから解の配列が明らかになる。

以上の関数を表 3 に纏めた。

表 3

get ( $T, +s$ ), get ( $T, -s$ )

試験管  $T$  の中から部分配列  $s$  を含む (含まない) DNA 分子を取り出す。

5 append ( $T, s, e$ )

試験管  $T$  の中にある末端条件  $e$  を満たす DNA 分子の端に配列  $s$  を付加する。

merge ( $T_1, T_2, \dots, T_n$ )

試験管  $T_1, T_2, \dots, T_n$  の中にある DNA 分子を一緒にする。

10 amplify ( $T, T_1, T_2, \dots, T_n$ )

試験管  $T$  の中にあるDNA分子を試験管  $T_1, T_2, \dots, T_n$  に (濃度を変えないで) 分注する。

detect ( $T$ )

試験管  $T$  の中にあるDNA分子を検出する。

上述の数式 4 に示すプログラムの主たる関数は `dna3sat` である。その中に先に述べた基本関数と、基本関数からなる `getuvwxyzsat` 関数が組み込まれている。最初にプログラム上の変数名の説明を行う。 $T$  とはチューブ (tube) の略であり、 $T_2$  とは  $x_1, x_2$  の 2 変数の取りうる全ての真偽の組 4 つを表すオリゴヌクレオチドを含む溶液である。 $X_1^T$  とは、変数  $x_1$  の値が真であることを示すオリゴヌクレオチドで長さは 22 塩基である。 $X_2^F$  とは、変数  $x_2$  の値が偽であることを示すオリゴヌクレオチドであり、長さは同じく 22 塩基である。よって  $T_2$  に含まれるオリゴヌクレオチドの 1 つ、 $X_1^T X_2^F$  は 4 4 塩基の長さの、 $x_1 = 1, x_2 = 0$  なる割り当てを表す 1 本鎖のオリゴヌクレオチドだる。 $j, k$  はループの進行状態を表す整数で、 $j$  は問題の論理式の何節目を計算しているかを示し、 $k$  は何番目の変数を計算しているかを表す。 $u, v, w$  は問題の論理式の各節内のひとつひとつのリテラルを示す。各リテラルは、数 2 の問題であれば、 $u_1 = x_1, v_2 = x_2, w_1 = \neg x_3$  となる。配列名  $X$  の上にあるバーは相補配列を意味する。また、 $X$  の右肩の  $T/F$  は  $T$  および  $F$  を指し、 $X^T$  と  $X^F$  を意味する。

30 プログラムの順を追って説明する。実際にはプログラム解釈部がこのプログ

ラムの関数および条件分岐、`f o r` ループを一連の実験操作に展開して実験計画を立てる。最初に問題の理論式はプログラムでの処理を容易にするために、各節で変数の添え字の昇順にリテラルを並べ替えておく。また、2変数  $x_1$ 、 $x_2$  に可能な割り当てを全て行った溶液  $T_2$  を準備しておく。

5 関す `d n a 3 s a t` において、最初の `f o r` ループの  $k = 3$ 、即ち、 $x_3$  に割り当てる値を決定するロープについて説明する。最初に `a m p l i f y` 関数で  $T_2$  を增幅する。この場合、增幅後、 $T_2$  と同じオリゴヌクレオチドを持つ  $T_w^T$ 、 $T_w^F$  に分注し、計 3 本の溶液チューブを得る。次に  $k$  のループ内の  $j$  の `f o r` ループに入る。ここでは、論理式の第  $j$  番目の節の充足性を評価する。

10 第 1 の条件分岐で、 $j = 1$  では第 1 節の第 3 リテラル  $w_1$  が  $x_3$  と等しいかを調べる。これは、電子計算部で予め論理式を調べ、`then` 以降を実行するかどうかを判断し、実験計画に入れるかを決定しておく。ループ内第 2 の条件分岐で第 1 節の第 3 リテラル  $w_1$  が  $\neg x_3$  であるので `then` 以降を実行する。

15 `g e t u v s a t` は下段に別に定義されており、それぞれの引数、 $T$  に対しては最初に `a m p l i f y` で生成した  $T_w^T$  チューブ（内容および濃度は  $T_2$  と同じ）、 $u$  に対しては  $u_1$  ( $= x_1$ )、 $v$  に対しては  $v_1$  ( $= x_2$ ) を入力する。最初の  $T_u^T$  は  $T_w^T$  の中から  $X_1^T$  を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより、 $T_u^T$  は  $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F\}$  という内容になる。次に  $T'_u^F$  は  $T_w^T$  の中から  $X_1^T$  を含まないオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより  $T'_u^F$  は  $\{x_1^F X_2^T, X_1^F X_2^F\}$  という内容になる。3つ目に  $T_u^F$  は、 $T'_u^F$  の中から  $X_1^F$  を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより  $T_u^F = \{x_1^F X_2^T, X_1^F X_2^F\}$  という内容になる。ここでのこの行は無視可能というコメントがあるが、生成される溶液の内容を見れば明白である。実験上エラーが生じることのないように加えた行であるので、念のための実行する。無視した場合は、前行の  $T'_u^F$  を  $T_u^F$  と読み替える。4番目の  $T_v^T$  は  $T_u^F$  の中から  $X_2^T$  を含むオリゴヌクレオチドを抽出して溶液を生成する。これにより、 $T_v^T = \{x_1^F X_2^T\}$  という内容になる。最後に `merge` 関数により、 $T_u^T$  と  $T_v^T$  が混合されて  $T^T$  が生成され、`return` により出力される。 $T^T$  は  $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F, x_1^F X_2^T\}$  となりもとの `d n a 3 s a t` 関数では溶液  $T_w^T$  と名を代えて扱うことになる。 $T^T$

の内容は第1節の第1、第2のリテラルが  $x_1 \vee x_2$  なる形であるので、第2リテラル  $\neg x_3$  がいかなる値であろうとも第1節の第1節が真である  $x_1, x_2$  の値の割り当ての組を示している。以上により、getuvsat 関数は既に 2つのリテラルに値が割り当てられている節について、3つ目のリテラルの変数に何を割り当てもその節が真であるような割り当てを表すオリゴヌクレオチドを選別する関数である。

次に、再び dna3sat 内の  $k = 3$  ループで  $j$  を1つ増加させ、 $j = 2$  で、第2節の計算に移る。この節では第3リテラルは第1節と同様に  $\neg x_3$  ので条件分岐に効いてくるのは下段の if 文である。第1節と同様に getuv sat を実行する。注意すべきは先に行った  $j = 1$  で  $T_w^T$  を生成していることである。また、 $v_2$  は  $v_2 = \neg x_2$  なる否定が入ったリテラルなので、getuv sat 関数の  $T_v^T$  を求める式において  $X_v^T$  は、 $X_2^F$  と読み替えて get 関数を実行する。こうすれば、 $j = 2$  で新たに得られる  $T_w^T$  は、 $\{x_1^T X_2^T, X_1^T X_2^F\}$  となる。

以降、順に  $j = 10$  まで実行する。途中、例えば、5節目以降のように3番目のリテラルが  $k = 4$  である場合は、 $j$  の値をインクリメントし、ループの次の処理を行う。 $k = 3$  で 10 節分のループが終了すれば、 $T_w^T$  の中の 3' 末端が  $X_2$  のオリゴヌクレオチドに真を表す  $X_3^T$  を append する。また、 $T_w^F$  中の 3' 末端が  $X_2$  のオリゴヌクレオチドに偽を表す  $X_3^F$  を append する。このあと append 後の溶液を merge し、 $k = 4$  のループに移る。 $k = 4$  のループが終了すれば、最終的にループを脱し、 $T_4$  チューブを detect ct 関数で処理する。

以上のように計算を実行するので、変数の数を  $n$ 、節の数を  $m$  とすると各基本コマンドの実行回数は、

$$25 (n-2) \times (\text{amplify} + 2 \times \text{append} + \text{merge}) + m \times (3 \times \text{get} + \text{merge})$$

である。即ち、変数の数と節の数にほぼ比例した時間で 3SAT 問題を解くことができる。

また、本発明において、detect 部分は、必ずしも反応結果を測定することを意味せず、反応結果が電子計算部へ利用可能に情報伝達されるか、或いは利用者が利用できる形態に変化または抽出された状態に特徴化されていれば

よい。また、*detect*部分は測定可能な状態に特徴化されていればよく、測定を人が行ってもよい。従って、本発明において、分子計算部は、反応が終了すると共に利用者が利用できるような生成物または成果物を提供するところまでを実施すればよい。利用者は、本発明の装置により提供された生成物または成果物を種々の目的、例えば、診断、治療、創薬、学術的研究、生物学的データベースの構築、生物学的情報の解読等へと最も効率よく利用することができる。

#### (4) 分子計算装置を用いた計算

本発明の1態様に従う分子計算装置に適した問題の例は、NP完全問題や3SAT等の純粹に数学的問題、ゲノム情報解析のように入力データが核酸分子で与えられるような問題、機能性分子の設計、および機能の評価を電子コンピュータで行うことが困難な問題等である。

以下に、本分子計算機により行う更なるゲノム情報解析の例を示す。まず、ゲノム情報を正規直交化DNA塩基配列で表現した数字であるDNAコード化数(DCN)の体型に変換する。その後、そのDCNに対するDNA計算を純粹に数学的問題を解くときのように行い、その計算結果から得られたゲノム情報を解析する。

この方法では、以下に示すような2種類の核酸プローブ、即ち、プローブAおよびプローブBが使用される(図23a)。

プローブAは、標的核酸の一部の領域の塩基配列Fに相補的な配列F' と、これに結合した結合分子からなる。

ここで、結合分子は、互いに特異的に高親和性を有する2つの物質の内の何れか一方の物質である。例えば、ビオチンまたはアビジン若しくはストレプトアビジン等である。また、結合分子は、直接に配列F'に結合しても、或いは任意の配列を解して間接的に配列F'に結合してもよい。間接的に結合する場合の任意の配列は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的な配列である。

プローブBは、標的核酸の一部の領域の塩基配列Sに相補的な配列S' とフラッグとからなる。本例におけるフラッグは二本鎖からなる。前記二本鎖は、複数のユニットからなる任意の配列を有す。また、フラッグは、これ自身が標

的核酸と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要である。

本方法に使用される配列  $F'$  および配列  $S'$  は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 15 以上の塩基数を有する。

5 ユニットの設計例を図 31 に示す。フラッグ  $FL$  の複数のユニットの各 1 ユニットは、10 塩基数以上としてよく、より好ましくは約 15 塩基数である。フラッグ  $FL$  のユニット数は、何れでもよいが、解析の容易さから 4 ユニットが好ましい。しかし、これに限られるものではない。

10 複数の標的核酸を同時に検出する場合には、多種類のユニットを組み合わせてフラッグ  $FL$  を構築する。たとえば、SD、D0、D1、ED の 4 ユニットからなるフラッグ  $FL$  を設計する場合を例とすると、先ず、22 種類のユニットを設計し、その中から 2 種類を選択してプライマーとなる SD ユニットと、もう 1 つのプライマーである ED ユニットとする。残りの 20 種類のユニットを用いて、各標的核酸の種類毎に、選択する 2 つのユニットの種類を変えることにより D0、D1 を設計すると、100 種類の異なる核酸配列を検出することが可能である（図 24 A）。

20 22 種類のユニットは、正規直交化された塩基配列により設計することが好ましい。正規直交化された塩基配列は  $T_m$  値が揃っており、相補配列以外とは安定したハイブリッドは形成しない。また、相補配列とのハイブリッド形成を阻害するような安定した 2 次構造は形成しない。これにより、最終的な検出時のミスハイブリを少なくすることが可能になる。したがって、検出精度を向上すること、および検出時間を短縮することが可能になる。また、ユニット数を増すことや、ユニットの種類を増すことにより、10000 種類の異なる核酸配列をも検出することが可能である。

25 図 23 を用いて、本例の方法を更に説明する。図 23 a に、4 ユニットからなるフラッグ  $FL$  の例を示した。該 4 ユニットは、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；以後、PCR 増幅または PCR 反応と称す）においてプライマーとなる SD ユニットと、標的核酸の種類を認識するための認識用ユニット、即ち、D0 ユニットおよび D1 ユニットと、およびもう 1 つのプライマー配列である ED ユニットとからなる。これ

らの各ユニットは、後の工程においては、夫々が読み取り枠となる。

検出は、まず上記のプローブAとプローブBを、標的核酸と混合する（図23a）ことにより行う。このとき、試料に含まれる標的核酸は、複数の異なる核酸分子群であってもよい。例えば、検出されるべき標的核酸の種類が100種類以下であるならば、D0ユニットは、D0-1からD0-10の10種類の中から選択され、且つD1ユニットは、D1-1からD1-10の10種類の中から選択される（図24A）。

次に、プローブA、プローブB、および標的核酸をハイブリダイゼーションに適した条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図23b）。ハイブリダイゼーションの条件は、例1に示す通りでよい。

かかるハイブリダイゼーションにより、プローブAおよびプローブBの両方が同一の標的核酸上に結合する（図23b）。

次に、標的核酸にハイブリダイズしたプローブAおよびプローブBを連結する（図23c）。連結の条件は、例1に示す通りでよい。

また、フラッグF LのT<sub>m</sub>値は、配列F' およびS' より高い温度に設計することが好ましい。これにより本検出方法におけるハイブリダイゼーション、ライゲーションおよび変性等の操作の加熱または冷却の際に、検出感度の低下をもたらすフラッグの変性を防ぐことが可能である。

20 次に、得られたフラッグ F L の情報を B / F 分離する。具体的には、プローブ (A + B) に具備される結合分子を、その対となるべき結合分子を介して固相担体に補足する (図 23 e)。

前記固相担体は、基板、ビーズ等の粒子、容器、纖維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等を用いることが可能であるが、好ましくはビーズである。

次に、結合分子に捕捉された状態で、プローブ (A+B) のフラッグ F L を変性し一本鎖にする (図 23 f)。得られた液相中の一本鎖配列 F L' に対して PCR 増幅を行なう (図 23 g)。上述したように、予めフラッグ F L には、2つのプライマー配列 S D および E D が配置してある。従って、このプライマー配列を利用して PCR 反応が容易に行ない得る。また、このとき、PCR

に使用する 2 つのプライマーの一方、たとえば S D 配列に、ビオチン等の結合分子を結合しておくことが好ましい。このときの P C R の詳細な条件は、設計したフラッグ F L に依存する。

続いて、該 P C R 反応の終了後、結合分子を固相した固相担体に結合することによって、P C R 産物である二本鎖配列を回収する（図 2 3 h）。ここで、固相化された担体は、前記結合分子と対になる結合対のもう一方の物質である。さらに、変性により配列 F L' を除き、一本鎖配列 F L のみを固相担体上で回収する（図 2 3 i）。

続いて、固相上的一本鎖フラッグ配列 F L の解析を行なう。まず、一本鎖フラッグ配列 F L が結合した前記固相担体を 10 等分する（D 1 ユニットが D 1 - 1 から D 1 - D 1 0 の場合）。各々に、標識分子と結合した D 1 - 1' から D 1 - 1 0' 配列の一つおよび全ての D 0' 配列（D 0 - 1' から D 0 - 1 0'）を加え、フラッグ配列 F L にハイブリダイズする。

続いて、ハイブリダイズした 2 つの核酸分子をライゲーションにより連結する。ここで、ライゲーションの条件および標識物質に関する定義は上述した通りである。その後、変性により連結された分子を液相に回収する。

得られた標識された核酸分子の解析は、予め D 0 - 1 から D 0 - 1 0 の核酸分子を固相化した D N A チップまたは D N A キャピラリ等に対して、ハイブリダイズすることにより行なうことができる。特に、D N A キャピラリは、D 0 - 1 から D 0 - 1 0 で 10 等分に分けられたものを同時に処理できるので、これにより分析は容易になるであろう。

例えば、各 10 種類の D 0 - 1 から D 0 - 1 0 と、D 1 - 0 から D 1 - 1 0 の配列を用いてフラッグ F L を設計した場合、図 2 4 A の 1 の位置には D 0 - 1 に相当する配列が固定され、標識された D 1 - 1' 分子と連結された拡散分子 6 3 にハイブリダイズされる。同様に、他の位置には列により相当する D 0 配列が固定され、行により相当する D 1' 分子と連結された拡散分子にハイブリダイズされる。このような行列の配置を、後述する D N A キャピラリに対して用いる（図 2 4 B）と解析が容易に行える。

ここでは、10 種類のユニットを用いた例を挙げたが、ユニットの種類は 10 種類に限られるものではなく、それ以下でも、それ以上でもよい。

ここで使用する「DNAキャピラリ」とは、標的核酸を検出するための装置であり、その内側に該標的核酸に対する相補的配列が結合されており、該相補的配列に標的核酸を結合することにより、該標的分子を検出する装置をいう。図24Bに示す通り、多数のDNAキャピラリを同時に使用し、且つ斜線で示した部分に、互いに異なるプローブを配置することにより、同時に多くの標的核酸を検出することが可能である。

また、本方法では、フラッグ配列FLの各ユニットには正規直交化配列が使用されているので、実施されるハイブリダイズの反応温度等の条件を均一化することが可能である。これにより、ミスハイブリを防止でき、高い精度が得られる。また、同一条件の下で一度に多くの解析を行なうことが可能であるため、検出時間の短縮化を達成することが可能である。また、本方法により複雑なゲノム情報をDNAの塩基配列で表現した数値に変換することも可能となり、DNA分子反応を利用した計算を行うことにより、多種類の情報や、互いに連鎖した複雑な遺伝子情報を容易に解析することが可能になる。また、コード化したのちに容易にコード化核酸を増幅できるので、少ないコピー数の標的配列であっても正確に且つ定量的に検出することが可能である。また、コード化することにより、多くの情報を圧縮することが可能である。従ってDNAチップまたはキャピラリーアレイ等の検出手段の所要数を節約することが可能である。

ここで使用する「エンコード反応」とは、ある塩基配列を、正規直交化塩基配列で表現されるコードに変換することをいう。上述の図23aからfの工程がこれに相当する。

また、ここで使用する「デコード反応」とは、前記で変換されたコードの読み取りを行ない、それにより元の情報を復元することをいう。

この方法では、上述したような1種類の標的核酸を検出するのみに留まらず、複数種類のフラッグ配列を設計すれば、同様な工程を経ることにより複数種類の標的核酸を同時に検出することも可能である。

### 【実施例】

#### 1. 分子計算

上述で説明した数式4のプログラムを本発明の分子計算装置を用いて実行し

た。装置の構成を以下に記す。該プログラムを実行した装置の構成を示す。本装置はプレシジョン・システム・サイエンス社、PSS社の核酸自動抽出装置 SX8Gを改造して製作した。本装置は制御のためのインテル社製 Pentium IIICPUを搭載した、OSがWindows 98のコンピュータ（即ち、電子計算部）と、実験を行なうための試薬槽と反応槽、XYZの位置制御のできるピペッタと、予備のピペッタ用チップ、温度をコンピュータで制御できるサーマルサイクラ（MJ Research社製のPTC-200）からなる実験ロボット（即ち、分子計算部）からなる。分子計算部の上から見た反応用部材の配置を図28に示す。

これらの反応容器の間で溶液の受け渡しが行われる。ストレプトアビジン磁気ビーズによるオリゴヌクレオチドの抽出は、ピペッタの特殊チップとチップに近づけたり離したりできる永久磁石により行なう。ただし、以上のシステムでは実行できなかった2つの操作、即ち $1\text{ }\mu\text{L}$ 程度の微量の酵素分注は人力で行い、detect関数でのキャピラリゲル電気泳動は、ベックマン・コールター社製P/ACE-5510キャピラリ電気泳動システムにより実行した。

試薬類とその初期配置を述べる。ライゲース酵素は先に述べたように人の手で分注するので装置外で保持した。分注はギルソン社製のピペットマン $2\text{ }\mu\text{L}$ のピペッタを用いた。

Xで表される各変数の値を示すオリゴヌクレオチドの長さは22塩基である。また、ここで $X_1^F X_2^F$ と記した場合 $5'$ 端側から順に $X_1$ が真であることを表すオリゴヌクレオチド、 $x_2$ が偽であることを示すオリゴヌクレオチドの配列をもつ1本鎖オリゴヌクレオチドであることを示す。また、ここで、配列名が「[]」に挟まれている場合は元の配列に相補的な配列を意味する。このため、例えば $[X_1^F X_2^F]$ ならば $X_1^F X_2^F$ に相補的なので、実際の配列は5端側から $X_2^F$ に相補的な配列、 $X_1^F$ に相補的な配列の順になっている。

$T_2$ 溶液 ( $X_1^T X_2^T$ 、 $X_1^F X_2^T$ 、 $X_1^T X_2^F$ 、 $X_1^F X_2^F$ それぞれ5pmolをライゲーション用緩衝溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$ に溶解した) をMTP35（即ち、マルチタイタープレート35）に保持した。ライゲーション反応用緩衝溶液、ストレプトアビジン磁気ビーズ、B&W溶液 (TE溶液にNaClを加えて、NaClが1Mなる濃度にした溶液を以降このように呼ぶ。この液はストレプトア

ビジン磁気ビーズにビオチン化オリゴヌクレオチドを捕獲したり、ハイブリダイゼーション反応を行うときに用いる) は図 28 の MTP 37 に保持した。

また、5' 端がビオチン標識されているビオチン化オリゴヌクレオチド [b X<sub>1</sub><sup>T</sup>] 、 [b X<sub>2</sub><sup>T</sup>] 、 [b X<sub>3</sub><sup>T</sup>] 、 [b X<sub>4</sub><sup>T</sup>] 、 [b X<sub>1</sub><sup>F</sup>] 、 [b X<sub>2</sub><sup>F</sup>] 、 [b X<sub>3</sub><sup>F</sup>] 、 [b X<sub>4</sub><sup>F</sup>] をそれぞれ 10 pmol ずつ B & W 溶液 20 μL に溶解したもの、5' 端がリン酸化されている appendオリゴヌクレオチド p X<sub>3</sub>、p X<sub>3</sub><sup>T</sup>、p X<sub>3</sub><sup>F</sup>、p X<sub>4</sub><sup>F</sup>、p X<sub>4</sub><sup>T</sup>、それぞれ 10 pmol をライゲーション緩衝溶液 20 μL に溶解したもの、5' 端にビオチン標識した連結オリゴヌクレオチド、[b X<sub>2</sub><sup>T</sup>X<sub>3</sub><sup>T</sup>] 、[b X<sub>2</sub><sup>F</sup>X<sub>3</sub><sup>T</sup>] 、[b X<sub>2</sub><sup>T</sup>X<sub>3</sub><sup>F</sup>] 、[b X<sub>2</sub><sup>F</sup>X<sub>3</sub><sup>F</sup>] 、[b X<sub>3</sub><sup>T</sup>X<sub>4</sub><sup>T</sup>] 、[b X<sub>3</sub><sup>F</sup>X<sub>4</sub><sup>T</sup>] 、[b X<sub>3</sub><sup>T</sup>X<sub>4</sub><sup>F</sup>] 、[b X<sub>3</sub><sup>F</sup>X<sub>4</sub><sup>F</sup>] それぞれ 10 pmol をライゲーション緩衝溶液 20 μL に溶解したものを MTP 35 に配置する。これらのオリゴヌクレオチド溶液および緩衝溶液などは分子計算機動作中は室温で保持した。ライゲース、detect 関数で用いる PCR 用ポリメレースは装置の外で氷中で、PCR 反応用緩衝溶液は室温で維持した。

それぞれの関数に対応する反応での装置の動作を順を追って説明する。

(a) amplicy 関数

左端の引数の溶液をテンプレートとし、PCR 増幅して元の溶液の濃度に維持して複数の溶液に分割する反応である。厳密にはもとの溶液のオリゴヌクレオチド濃度を測定してからでなければ増幅できないが、実際には最初の T<sub>2</sub> で各オリゴヌクレオチドが 5 pmol で 20 μL の溶液に溶解しているので、20 μL の溶液に各オリゴヌクレオチドが数 pmol 溶解しているようにする。即ち、1 溶液 1 オリゴヌクレオチドあたり 2 pmol とするならば、PCR 反応液の組成は次の通りである。

25 ポリメレース酵素 (宝酒造) 0.5 μL (2.5 U)

増幅DNAの溶液 1 fmol 程度の各々のオリゴヌクレオチドを含む

dNTP混合溶液 8 μL (2.5 mM、付属品)

反応バッファ 10 μL (10 倍希釀で使用、付属品)

プライマー 各オリゴヌクレオチドに forward、reverse

30 e 側とも 5 pmol ずつ準備

滅菌蒸留水 全液量が  $100 \mu L$  になるように加えた

増幅には宝酒造の Pyrobest<sup>TM</sup> DNA Polymerase の PCR 増幅キットを用いた。反応温度条件は、以下の通りである。

即ち、

- 5 1. 95°C 30秒
2. 50°C 30秒
3. 72°C 60秒 1~3を30サイクル

である。

PCR 反応液の量は分割する溶液の数に応じて変えた。PCR の後、反応液から PCR 産物をストレプトアビジン磁気ビーズ（ロシュダイアグノスティクス）で捕獲する。磁気ビーズ原液  $50 \mu L$  ( $0.5 \text{ mg}$ ) をとり、ここから磁石により磁気ビーズのみを抽出して液を B & W 溶液  $50 \mu L$  に置換する。この磁気ビーズ液と PCR 反応液  $50 \mu L$  とを混ぜて PCR 産物を捕獲する。捕獲した後、溶液を B & W 溶液  $50 \mu L$  に置換し、 $88^\circ\text{C}$ まで昇温して 1 本鎖オリゴヌクレオチドを解離させて抽出した。以上の作業は実験装置では行わず、人の手で行った。

(b) `get` 関数

`get (T, +S)` と `get (T, -S)` は一連の操作で同時にを行う。

(1) 抽出する溶液 T を  $50 \mu L$  準備し H のサーマルサイクラに吐出した。

20 (2) T に捕獲する配列の相補鎖をビオチン化したオリゴヌクレオチドを  $20 \text{ pmol}$  を含む B & W 溶液  $50 \mu L$  をさらに加えて最初のハイブリダイゼーション反応を行った（下記反応温度条件の 1, 2）。

ピペッタは各 MTP から液をとり反応を進める。反応温度条件は以下の通りである。即ち、

- 25 1. 95°C 1分
2. 25°C 10分 (1から2までは  $10^\circ\text{C}/\text{分}$  で温度を下げる)
3. 56°C 3分 (2から3までは  $10^\circ\text{C}/\text{分}$  で温度を上げる)
4. 75°C 3分 (3から4までは  $10^\circ\text{C}/\text{分}$  で温度を上げる)

30 であり、ピペッティングの作業時間を確保しながらサーマルサイクラを制御した。

(3) 2の温度の途中で磁気ビーズ原液 50  $\mu$  L 分を分散した B & W 溶液 50  $\mu$  L を混合し、磁気ビーズにビオチン化オリゴヌクレオチドのハイブリッドを捕獲した。磁気ビーズは再びサーマルサイクラー 96 穴 MTP 38 に保持した。

5 磁気ビーズ液は装置のピペッタに一度吸い込まれた後、ピペットのチップの中の空洞に保持される。このとき液を保持したチップにピペッタに取り付けた移動可能な永久磁石を接近させてビーズを集める。この間にピペットから排液して新たな溶液を吸引すれば溶液の置換や、2本鎖核酸の相補鎖の分離を行うことができる。磁気ビーズを溶液に分散するためには永久磁石を離して数回ピペッティングを行えば十分に攪拌されて磁気ビーズは溶液に分散する。

10 (4) 次に 3 の温度条件に進む。ここではハイブリダイゼーションしなかつたオリゴヌクレオチドを集めるコールドウォッシュ工程を行う。56°Cにて B & W 溶液 50  $\mu$  L にオリゴヌクレオチドを抽出し E の MTP に出力した。これが *g e t* (T, -S) の出力オリゴヌクレオチド溶液である。

15 (5) 温度条件 4 のホットウォッシュ工程では 4 のようにさらに温度を上げて、磁気ビーズに捕獲されているオリゴヌクレオチドをコールドウォッシュと同様 50  $\mu$  L の B & W 溶液に抽出して MTP 35 に出力した。これが *g e t* (T, +S) の出力オリゴヌクレオチド溶液である。

20 (c) *merge* 関数

ごく簡単なピッティング操作で実行した。ピペッタで混合する溶液をそれぞれ吸引し、全て 1箇所の MTP のウェルに集めて混ぜることで実現した。

25 (d) *append* 関数

図 30 に示す反応である。*append* するオリゴヌクレオチドが異なれば、別々の反応チューブで反応して同時にいった。

25 (1) *append* 反応する溶液を 20  $\mu$  L、MTP 35 よりピペッタで吸引し、サーマルサイクラー 38 に吐出する。そのほか、*append* 反応に必要な下記の溶液を反応用ウェル 38 まで運搬した。

*append* 反応には、New England Bio Labs 社の Taq ライゲースとその専用緩衝溶液とを用いた。

30 反応溶液は以下の通りである。

Taq ライゲース (NEB) 0.5  $\mu$  L (20 U)

反応DNAの溶液 原液 20  $\mu$  L

反応バッファ 12  $\mu$  L (10倍希釈で使用、付属品)

連結オリゴヌクレオチド 各 10 pmol

5 appendオリゴヌクレオチド 各 10 pmol

滅菌蒸留水 全液量が 120  $\mu$  L になるように加えた。

(2) ライゲーション反応を行った。サーマルサイクラの制御は下のように行つた。ライゲーション反応を行つたのは 1, 2 温度条件の時である。反応温度条件は以下の通りである。即ち、

10 1. 95°C 1分

2. 58°C 15分 (1から2までは 10°C/分で温度を下げる)

3. 25°C 10分 (2から3までは 10°C/分で温度を下げる)

4. 70°C 3分 (3から4までは 10°C/分で温度を上げる)

5. 74°C 3分 (4から5までは 10°C/分で温度を上げる)

6. 88°C 3分 (5から6までは 10°C/分で温度を上げる)

とした。

(3) 反応温度条件 3 の 25°C に下がつてから磁気ビーズによる捕獲を行つた。このとき、磁気ビーズを分散している溶液は捨て、ビーズをチップ内に保持したままサーマルサイクラ 38 からライゲーション緩衝溶液を直接ピペッタで吸引した。すなわちライゲーション緩衝溶液中で捕獲反応を行つた。緩衝溶液が捕獲のための液でないため念のため 60 回吸引吐出を行い十分な量を捕獲できるようにした。磁気ビーズはサーマルサイクラ 38 に保持した。

(4) 続いて 1 回目のコールドウォッシュを行つた。核酸ハイブリッドの長さと溶液の塩濃度から 70°C が適温である。4 の 70°C まで昇温したらサーマルサイクラ 38 から磁気ビーズ液を吸引し、永久磁石でビーズを集め、溶液のみを MTP 35 に吐出した。この溶液は廃液である。

(5) そのまま、ピペッタで MTP 37 の B & W 溶液 50  $\mu$  L を吸引し、永久磁石を離して磁気ビーズを分散させてサーマルサイクラ 38 に戻した。サーマルサイクラ 38 では反応温度 5 にし、2 回目のコールドウォッシュを実行した。ここでは (4) と同様に適温になつたらサーマルサイクラ 38 から吸引し

、永久磁石でビーズを集めてB&W溶液のみをM T P 3 5に吐出した。この溶液も廃液である。

(6) このあと、さらに再びピペッタでM T P 3 7のB&W溶液50 $\mu$ Lを吸引し、永久磁石を離して磁気ビーズを分散させてサーマルサイクラ38に戻した。サーマルサイクラ38で反応温度6になったとき、溶液中にa p p e n d反応の済んだ1本鎖オリゴヌクレオチドが解離してくるのでこれをサーマルサイクラ38から吸引し、永久磁石でビーズを集め、溶液のみをM T P 3 5に吐出し保持した。

#### (e) detect 関数

図32に示す反応と、キャピラリゲル電気泳動による検出でおこなった。最終的に得られた解を表すオリゴヌクレオチドを含むであろう溶液をテンプレートとし、graduated PCRを行った。PCRはプライマーの組ごとに反応液を分けて行い、それぞれのPCR産物の有無および長さを検出することで解の配列を調べた。

(1) 解を含むと考えられるオリゴヌクレオチド溶液をテンプレートとする。プログラム中でamp1ifyによりオリゴヌクレオチドの濃度は維持されているので、それからテンプレート濃度を推定し液量を定める。

PCR反応液の組成は、

ポリメレース酵素(宝酒造) 0.5 $\mu$ L (2.5U)

增幅するDNAの溶液 1 fmol程度の各々のオリゴヌクレオチドを含むだけの量

d NTP混合溶液 8 $\mu$ L (2.5mM、付属品)

反応バッファ 10 $\mu$ L (10倍希釈で使用、付属品)

プライマー 各オリゴヌクレオチドにforward, reverse側とも5 pmolずつ準備

滅菌蒸留水 全液量が100 $\mu$ Lになるように加えたとした。

増幅には宝酒造のPyrobest DNA Polymerase PCR增幅キットを用いた。反応温度条件は、

1. 95°C 30秒

2. 50°C 30秒

3. 72°C 60秒 1~3を30サイクルであった。

本実験で用いたプライマーは次の12組である。

( $X_1^T$ , [ $X_2^T$ ])、( $X_1^T$ , [ $X_2^F$ ])、( $X_1^T$ , [ $X_3^T$ ])、( $X_1^T$ , [ $X_3^F$ ])、( $X_1^T$ , [ $X_4^T$ ])、( $X_1^T$ , [ $X_4^F$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_2^T$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_2^F$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_3^T$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_3^F$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_4^T$ ])、( $X_1^F$ , [ $X_4^F$ ])。

これらをMTP35の異なるウェルに保持しておく。PCR反応時にプライマー溶液はピペットで吸引してサーマルサイクラ38の異なるウェルに吐出し、反応に必要な溶液を加えてサーマルサイクラ38を設定通りに動作させれば反応は完了する。この作業は容易に自動化できる。この後のキャピラリゲル電気泳動装置での試料のキャピラリへの導入も自動化できる。キャピラリゲル電気泳動ではペックマン・コールター社のds1000ゲルキットを使用した。プライマー $X_1^T$ にはFITCが標識されているため泳動像が観察された。今回の実施例では以上のdetectの作業はキャピラリゲル電気泳動も自動では行わず、人の手で行った。以上的方法でプログラムの各関数を実行して得られた結果を図35に示した。

分子計算装置によるゲノム情報解析という計算パラダイムの有効性を示すために、実際に遺伝子の発現解析を行うDNA計算の実験を行った。計算はダイナミックプログラミングで3SATの問題を解くときに使用するget、append、amplify、mergeおよびdetectの基本命令を用いて実行することができる。最初の計算反応はエンコード反応である。単一試験管内で行える計算反応で、遺伝子の転写産物の情報がappend命令によりDCNに変換される。変換テーブルは、アダプター分子 $A_i$ で表現され、2桁n進数のDCNへの一対一対で変換される。すでに200以上のDCNを得てるので、2桁100進数のDCNにより10,000種類の遺伝子をエンコードすることができる。その後、amplify命令により増幅とn本の試験管への分注反応が行われる。最後にn本の試験管に対してappendとget命令によりDCNをデコードする計算反応が行われる。デコード反応はn本の試験に対して並列に行うことができる。移植断片対宿主病関連の転写産物の

cDNA入力データとして実験を行ったところ、計算反応が特異的且つ定量的に進むことが確認された。

D C Nに対するDNA計算により、遺伝子の発現情報解析を行う方法は、DNAチップで直接に転写産物分子を解析する方法に比べて優れた点をいくつか有している。性質が一様なD C Nに変換してから增幅するので、もとの頻度分布を崩さずに増幅して解析することが可能である。また、D C Nデコードで「get」命令を並列に行うためのDNAチップは、同じD C Nの体系である限り同じものを使用することができる。その上、DNAプローブの数も大幅に少ない。DNAチップを作製する手間とコストが大幅に軽減される。更に、正規直交化されたプローブのハイブリダイゼーション反応は最適化されており、正確な計算処理を行うことが可能である。

このような本発明の態様によれば、上述したような分子計算機の高い並列計算性を活かし、しかも分子計算機だけでは実現することが難しい機能を電子計算機により補完することにより、操作する者が分子計算のための実験計画や符号化分子の割り当て等を行う必要はなくなる。

また、本計算装置を用いて遺伝子解析を行った場合、特定の配列を有する核酸を標的としてそれらの存在または不存在を評価することや、またそれによって、例えば、遺伝子型や遺伝子の発現の状態を決定することが、小さい実験誤差で、低コストで、且つ簡便に行うことが可能である。

更にまた、本発明は、上述の記載に基づいて以下の方法および分子計算用ソフトウェアも提供する。即ち、電子計算部と分子計算部とを、電気学的プログラムが認識可能に表現された分子情報に基づいて一体的に機能させることを特徴とする分子計算方法を提供するものである。

また、電子計算部と分子計算部とを具備する分子計算装置に適用するためのソフトウェアであって、前記電子計算部および／または前記分子計算部に適用され、前記電子計算部による計算作業と前記分子計算部による計算作業とを、各計算部で電気学的に認識可能な情報形式で機能させることを特徴とする分子計算用ソフトウェア、詳しくは、分子計算部により計算した情報を、電子計算部の電気学的プログラムに適合するような情報形式に変換する機能を有することを特徴とする分子計算用ソフトウェア、更に詳しくは、電子計算部により計

算した情報を、分子計算部の計算作業に適合するような情報形式に変換する機能を有する分子計算用ソフトウェアを提供することである。

本発明の分子計算ソフトウェアを用いることにより、上述の本発明の計算装置の実行を容易に行うことが可能である。また、当該分子計算ソフトウェアは、本発明の計算装置を総括して管理しても、またその構成要素の一部分を独立して管理しても、または構成要素の幾つかの部分を組み合わせて連動して管理してもよい。

Additional advantages and modifications will readily occur to those skilled in the art. Therefore, the invention in its broader aspects is not limited to the specific details and representative embodiments shown and described herein. Accordingly, various modifications may be made without departing from the spirit or scope of the general inventive concept as defined by the appended claims and their equivalents.